

Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid



FACULTAD DE
CIENCIAS



**Función de las proteínas de la familia bHLH
Daughterless y Extramacrochaetae en el
control de la proliferación y el ciclo celular de
*Drosophila melanogaster***

Memoria presentada por

Irene Andrade Zapata

para optar al grado de Doctor en Ciencias por la

Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2014

Director: Dr. Antonio Baonza Cuenca

Tutor: Prof. Jose Félix de Celis Ibeas

**Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Desarrollo y Diferenciación del
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)**

A mis padres

A Fer

ÍNDICE

RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	21
1. La Biología del Desarrollo	21
2. <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	21
3. El desarrollo de los discos imaginales	22
4. El desarrollo del ala de <i>Drosophila melanogaster</i>	24
5. El ciclo celular y el control de la proliferación en <i>Drosophila melanogaster</i>	25
5.1. La fosfatasa String durante el desarrollo de los discos imaginales	27
6. La familia de proteínas bHLH	28
6.1. Extramacrochaetae es necesario para múltiples funciones durante el desarrollo	30
6.1.1. Función de Extramacrochaetae en el control de la proliferación	32
6.1.2. Las proteínas Id, ortólogos de Extramacrochaetae en vertebrados	32
6.2. La proteína Daughterless y sus ortólogos en vertebrados, las proteínas “E”, en el control de la proliferación celular	33
7. Caracterización de nuevos factores que interaccionan con Emc: el gen CG34422 de <i>Drosophila melanogaster</i>	34
7.1. Características moleculares de CG34422	35
7.2. Las proteínas de la familia ARID	36
7.3. Papel de Arid4a-b en la progresión del ciclo celular en vertebrados	37
7.4. El gen CG34422 como parte del complejo Sin3A/Rpd3 de <i>Drosophila</i>	38
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. Cultivo de <i>Drosophila melanogaster</i>	47
2. Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i> Gal4, UAS y construcciones reporteras	47
3. Sistema Gal4/ Gal80 ^{ts}	48
4. Análisis clonal	48
4.1. Cálculo del tiempo de duplicación celular	50
5. Tinciones inmunohistoquímicas	50
6. Hibridación <i>in situ</i>	51

7. Métodos de microscopía y procesamiento de imágenes	51
7.1. Microscopía óptica	51
7.2. Microscopía confocal	51
7.3. Procesado de imágenes	51
8. Cálculo del índice mitótico y cuantificación de fluorescencia en discos imaginales	51
9. Preparación de alas adultas y cuantificación del tamaño del ala	52
10. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	52
11. Producción del anticuerpo anti-CG34422	53
12. Experimentos de inmunoprecipitación (<i>pull down</i>)	56
13. Ensayo de Retardo en Gel	58
14. Clonaje de fragmentos de ADN	60
14.1. Clonaje del promotor mínimo de <i>stg</i> en <i>pGL2</i>	60
14.2. Generación de reporteros <i>GFP</i> del promotor mínimo de <i>stg</i>	61
14.3. Clonación de <i>daughterless</i> en el vector <i>pAC5.1</i>	62
14.4. Construcción de los vectores <i>pUAS-CG34422-Nt</i> y <i>pUAS-CG34422-Ct</i>	62
15. Cultivos celulares y medición de actividad Luciferasa	63
16. Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa (qPCR)	63
17. Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina seguidos de qPCR (ChIP-qPCR)	65
18. Análisis estadístico	67

RESULTADOS ■ 71

PRIMERA PARTE: Función de las proteínas bHLH Extramacrochaetae y Daughterless en el control de la proliferación y la progresión del ciclo celular 71

1. Estudio de los requerimientos del gen <i>extramacrochaetae</i> durante el desarrollo del ala y el notum de <i>Drosophila melanogaster</i>	71
1.1. Descripción de los fenotipos de falta de función de <i>emc</i> durante el desarrollo del disco imaginal de ala	71
1.1.1. Análisis de los fenotipos de falta de función de <i>emc</i> en relación con la proliferación y el ritmo de la división celular	73
1.1.2. Papel de la muerte celular en los fenotipos de falta de función de <i>emc</i>	75
1.1.3. Análisis de los fenotipos de falta de función de <i>emc</i> en relación con la progresión del ciclo celular	76

1.1.4. Estudio del papel de la proteína reguladora del ciclo celular <i>String</i> en los defectos en la proliferación causados por la falta de función de <i>emc</i>	77
1.2. Descripción de los fenotipos de ganancia de función de <i>emc</i> durante el desarrollo del ala y el notum	81
1.3. Estudio de los efectos de la mutación de regiones conservadas de la proteína <i>Emc</i> sobre su fenotipo de ganancia de función en el ala y el notum	82
1.4. Descripción de los fenotipos de ganancia de función de las proteínas <i>Id</i> durante el desarrollo del ala y el notum	84
2. Análisis de la relación funcional entre <i>emc</i> y la proteína bHLH <i>Daughterless</i> durante el desarrollo del disco de ala	84
3. Estudio de los requerimientos del gen <i>daughterless</i> durante el desarrollo del ala y el notum de <i>Drosophila melanogaster</i>	86
3.1. Descripción de los fenotipos de falta de función de <i>daughterless</i> durante el desarrollo del ala de <i>Drosophila</i>	86
3.2. Descripción de los fenotipos de ganancia de función de <i>daughterless</i> durante el desarrollo del ala de <i>Drosophila</i>	86
3.2.1. Estudio de los efectos causados por ganancia de función de <i>daughterless</i> sobre la proliferación y la progresión del ciclo celular	88
3.2.2. Papel de la muerte celular en los fenotipos de ganancia de función de <i>daughterless</i>	88
3.2.3. Estudio de los efectos producidos por la ganancia de función de <i>daughterless</i> sobre las proteínas reguladoras de la transición G2/M	90
3.2.4. Análisis de la relación funcional entre <i>daughterless</i> y <i>string</i> : descripción de la interacción entre ambos genes en condiciones de ganancia de función	92
3.2.5. Estudio de los fenotipos producidos por reducción de la expresión de <i>daughterless</i> sobre la transcripción de <i>string</i>	93
4. Estudio de la función de <i>Daughterless</i> como represor directo de la transcripción de <i>string</i>	94
4.1. Análisis de la región reguladora de <i>string</i> y conservación de sitios de unión de <i>Daughterless</i> en esta región	94
4.2. Función de <i>Daughterless</i> como represor de elementos reguladores de <i>string</i>	97
4.3. Estudio de la unión directa de <i>Daughterless</i> a la región promotora de <i>string</i>	99
4.4. Estudio in vitro de la represión del promotor mínimo de <i>string</i> mediada por <i>Daughterless</i>	100
4.5. Análisis del promotor mínimo de <i>string</i> como región represora	102

4.6. <i>Análisis del papel del dominio de represión “Rep” en la función de Daughterless como represor de string</i>	104
5. Implicación de los complejos Ac/Sc y E(spl) en los efectos de <i>da</i> como inhibidor de la proliferación	106
5.1. <i>Estudio de la relación del complejo achaete-scute y da</i>	106
5.2. <i>Estudio del papel de las proteínas del complejo E(spl) y Groucho como posibles mediadores de los efectos de Da sobre la proliferación</i>	107
6. Emc y Da como integradores de señales intracelulares que controlan la proliferación celular	108
6.1. <i>Análisis de la expresión de Emc en condiciones de activación de la vía de Notch</i>	108
6.2. <i>Estudio del efecto de la eliminación de emc y la sobre-expresión de Da sobre el aumento proliferativo y los sobre-crecimientos producidos por la activación de la vía de Notch</i>	108
7. Análisis de los niveles de expresión de <i>da</i> y <i>emc</i> durante el desarrollo del disco de ala de <i>Drosophila</i>	111

SEGUNDA PARTE: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DE NUEVOS MEDIADORES DE LAS FUNCIONES DE Emc EN EL ALA DE DROSOPHILA.

ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL GEN CG34422	113
1. Búsqueda de proteínas que interaccionan con Emc mediante el ensayo de Doble Híbrido de levaduras y confirmación de los resultados obtenidos	113
2. Descripción de las características moleculares y fenotípicas del gen CG34422	115
2.1. <i>Análisis de la homología de secuencia entre el gen CG34422 y sus ortólogos humanos arid4a y arid4b</i>	115
2.2. <i>Expresión de CG34422 en los tejidos larvarios de Drosophila</i>	115
2.3. <i>Análisis del fenotipo de disminución de la expresión del gen CG34422</i>	117
2.4. <i>Análisis del fenotipo de sobre-expresión del gen CG34422</i>	117
3. Estudio de la función del gen CG34422 en el control de la proliferación y la muerte celular	121
4. Estudio de la interacción de CG34422 con genes reguladores del ciclo celular	124
5. Análisis de los fenotipos resultantes de la interacción genética entre el gen CG34422 y <i>emc</i>	127
6. Análisis de los fenotipos resultantes de la interacción genética entre el gen CG34422 y <i>daughterless</i>	129
7. Análisis de los fenotipos resultantes de la interacción genética de <i>emc</i> y CG34422 con	

los miembros del complejo Sin3A/ Rpd3	131
DISCUSIÓN ■	137
1. Emc y Daughterless controlan la progresión del ciclo celular regulando la expresión de <i>string</i>	137
2. Daughterless actúa como represor transcripcional de <i>string</i>	138
3. Emc y Daughterless podrían estar regulando otras fases del ciclo celular	139
4. Redundancia funcional entre Daughterless y otros factores en la represión transcripcional de <i>string</i>	140
5. Emc y la competición celular	140
6. Funciones de Emc y Daughterless en la regulación de la proliferación celular en el disco de ala	141
7. Función del gen <i>CG34422</i> durante el desarrollo del disco de ala	143
8. Función de <i>CG34422</i> como mediador de las funciones de Emc	144
9. Relación funcional entre <i>CG34422</i> y Daughterless	145
10. Emc como un posible modulador de cambios epigenéticos	146
CONCLUSIONES ■	151
BIBLIOGRAFÍA ■	155
ABREVIATURAS ■	173
AGRADECIMIENTOS ■	179
PUBLICACIONES ■	187

Resumen/Summary

La familia de proteínas bHLH lleva a cabo importantes funciones durante el desarrollo en todos los metazoos. Las bHLH de clase I y sus inhibidores de la clase V están representados en *Drosophila melanogaster* por las proteínas Daughterless (Da) y Extramacrochaetae (Emc), cuyas funciones están evolutivamente conservadas. Estas proteínas poseen importantes funciones en el establecimiento de distintos destinos celulares. Además se ha propuesto que su función es requerida para regular la proliferación celular. A pesar de que se han llevado a cabo diversos estudios para analizar la función de esta familia de proteínas en el control de la proliferación, aún se desconoce el mecanismo mediante el cual se produce esta regulación. Parte de las dificultades para establecer estos mecanismos reside en el hecho de que la mayoría de los análisis acerca de la función de estas proteínas en el control de la proliferación se han realizado en células de vertebrados. En estos organismos existen varios homólogos para cada uno de los componentes de las distintas clases que componen la familia de proteínas bHLH, lo que implica un alto grado de redundancia genética. En esta Tesis, aprovechado el hecho de que en *Drosophila* sólo existe un representante para estas dos clases de proteínas bHLH, hemos podido establecer un mecanismo molecular acerca de cómo estas proteínas controlan el ciclo celular y por tanto la proliferación.

Nuestros datos indican que durante el control del ciclo celular Emc ejerce su principal función bloqueando la actividad de Da. Durante este proceso, Da funciona como un represor transcripcional de la fosfatasa Cdc25 (*string*), que es el principal efector de la transición entre las fases G2 y M del ciclo celular. De manera que en las células con altos niveles de Emc, la actividad de Da sería mínima, lo que facilitaría la entrada en Mitosis y por tanto mantendría a las células en un estado proliferativo. De acuerdo con este modelo, la actividad de distintas rutas de señalización que regulasen la actividad y/o la función de Emc, darían lugar a cambios en la función de Da y por consiguiente alterarían la capacidad proliferativa de las células. De manera que Emc funcionaría como un posible integrador de distintas señales celulares.

Por otro lado, hemos identificado y caracterizado un nuevo modulador de la actividad de Emc, el gen *CG34422*. Este gen codifica para una proteína que forma parte de un complejo modificador de la cromatina, llamado Sin3A. La función de este gen es necesaria durante el control de la proliferación celular. En este trabajo presentamos distintas evidencias que apoyan que Emc interacciona con *CG34422* y con algunos de los miembros del complejo Sin3A, de manera que Emc podría intervenir en el control de la transcripción a través de su acción directa sobre el estado de apertura o cierre de la cromatina.

The bHLH family of transcription factors play significant roles during development in all metazoans. The E protein family, and their inhibitors the Id proteins, are involved in the regulation of cell commitment and proliferation. This notion is further supported because the activity of these factors is frequently deregulated in cancerous cells. The E protein orthologue Daughterless (Da) and the Id orthologue Extramacrochaetae (Emc) are the only members of these classes of bHLH proteins in *Drosophila*; this represents an advantage because it eliminates genetic redundancy. Although previous reports suggest that these factors are involved in controlling proliferation, the mechanism underlying this regulatory activity is poorly understood.

Through a genetic analysis, we show that during the development of epithelial cells in the imaginal discs, the G2/M transition, and hence cell proliferation, is controlled by Emc via Da. In eukaryotic cells, the main activator of this transition is the Cdc25 phosphatase, *string*. Our genetic analyses reveal that the ectopic expression of *string* in cells with reduced levels of Emc or high levels of Da is sufficient to rescue the proliferative defects seen in these mutant cells. Moreover, we present evidence demonstrating a role of Da as a transcriptional repressor of *string*, defining a novel mechanism through which Emc controls cell proliferation by regulating the activity of Da, which transcriptionally represses *string*. Emc could be targeted by different cell signals that regulate its function and thereby modify Da activity, which in turn could alter cell proliferation parameters. Thus, these two proteins may act as integrator molecules that collaborate to combine distinct cellular inputs.

We have also identified a new *emc* modulator, the protein encoded by *CG34422* gene, which belongs to a chromatin-modifying complex. We have found that these two genes collaborate to promote cell proliferation. Both proteins interact with some members of the Sin3A/Rpd3 complex, opening a new insight by which Emc could regulate transcription through the regulation of chromatin accessibility.

Introducción

1. La Biología del Desarrollo

La Biología del Desarrollo es la disciplina que estudia cómo a partir de una célula indiferenciada se forma un organismo completo. Los organismos pluricelulares se desarrollan a partir de un cigoto, cuyas células se dividen para posteriormente especificarse y dar lugar a los distintos órganos y tejidos que conforman un individuo adulto. La formación de un órgano requiere que los tipos celulares que lo componen coordinen multitud de procesos como el crecimiento, la proliferación, la apoptosis, la diferenciación y la morfogénesis. La diferenciación celular es el resultado de la ejecución de un estricto programa genético que en muchos casos es irreversible, y que conduce a la formación de tipos celulares específicos, destinados a cumplir una función dentro de un órgano o tejido.

Para el estudio de la Biología del Desarrollo se emplean distintos organismos modelo, tanto del reino animal, como los invertebrados *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y los vertebrados *Mus musculus* (ratón), *Danio rerio* (pez zebra), *Gallus gallus* (pollo) y *Xenopus laevis* (rana africana) entre otros, como del reino vegetal (*Arabidopsis thaliana*).

2. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Drosophila melanogaster, la mosca de la fruta, se ha utilizado como organismo modelo en el campo de la Biología y la Genética del Desarrollo desde principios del siglo XX, cuando comenzó a ser estudiada en el laboratorio de Thomas Hunt Morgan. Su éxito como organismo modelo radica en que presenta un tiempo de generación corto, gran número de descendientes y un genoma de tamaño reducido. Además, se conoce que los genes implicados en el desarrollo de *Drosophila*, salvo algunas excepciones, están evolutivamente conservados en los organismos superiores (Reichert, 2002; Shulman *et al.*, 2003; Donner y Maas, 2004), lo cual aumenta su valor como modelo experimental. Su desarrollo embrionario comienza tras la fecundación del huevo y tiene una duración de 24h, tras el cual comienza la fase larvaria. Esta fase dura alrededor de 5 días y está dividida en tres estadios larvarios, separados entre sí por dos mudas. Tras concluir el desarrollo larvario comienza la fase pupal, que transcurre durante 4 días, y en la que tiene lugar la metamorfosis que dará lugar al individuo adulto o imago (Figura 1).

El genoma de *Drosophila* está contenido en 4 pares de cromosomas: un par sexual (los cromosomas X e Y), y tres pares de cromosomas autosómicos (II-IV). Ya que este organismo se ha utilizado clásicamente como modelo para el análisis genético del desarrollo, se dispone de un gran número de sofisticadas herramientas genéticas para la experimentación, lo que hace de él un organismo idóneo para caracterizar genética y molecularmente distintos procesos que ocurren durante el desarrollo. Además, la secuenciación del genoma de *Drosophila* (compuesto por cerca de 14.000 genes (Adams *et al.*, 2000)), ha supuesto un gran avance para el desarrollo de nuevas

técnicas de análisis. Todo lo mencionado anteriormente hace de *Drosophila* uno de los organismos modelos más utilizados en Biología del Desarrollo.

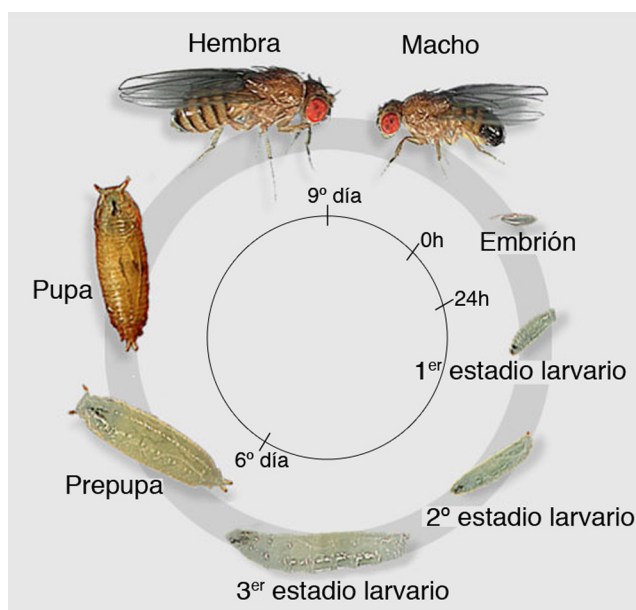


Figura I 1: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Imágenes de las diferentes fases del desarrollo de *Drosophila*. Tras 24h de desarrollo embrionario (Embrión), surge una larva que pasa por distintos estadios larvarios. La larva sufre 2 mudas que separan los 3 estadios larvarios. La fase pupal se inicia al sexto día (Prepupa). A lo largo de esta fase (Pupa) tiene lugar la metamorfosis, que dará lugar al individuo adulto o Imago. Modificado de FlyMove (flymove.uni-muenster.de/).

3. El desarrollo de los discos imaginales

Todos los elementos cuticulares que conforman el adulto de *Drosophila* se forman a partir de los discos imaginales. Estas estructuras se originan a partir de un grupo de entre 10 y 40 células que se especifican en el ectodermo embrionario en posiciones invariables (Cohen *et al.*, 1993; Bate, 1993). Durante el desarrollo larvario, los primordios de los discos imaginales proliferan y se invaginan, dando lugar a sacos epiteliales formados por dos capas de células indiferenciadas: un epitelio columnar pseudoestratificado, que contiene la mayoría de las células del disco y que dará lugar a todas las estructuras epidérmicas adultas (excepto las que forman el abdomen) y un epitelio escamoso peripodial, necesario para la eversión de los discos durante la metamorfosis (Fristrom y Fristrom, 1993; Pastor-Pareja *et al.*, 2004, Aldaz *et al.*, 2013) (Figura I 2B).

Cada disco imaginal da lugar a estructuras epiteliales independientes, por lo que existe un disco para cada elemento cuticular del adulto (Wolpert *et al.*, 1998) (Figura I 2A). El abdomen deriva de células denominadas histoblastos, las cuales proliferan durante el estadio pupal (García-Bellido y Merriam, 1971). En el momento de la metamorfosis, las células de los discos dejan de proliferar y comienzan a diferenciarse. Durante la pupación, se produce la histólisis de los tejidos larvarios y la evaginación de los discos imaginales maduros (Cohen, 1993; Pastor-Pareja *et al.*, 2004). Finalmente, para la formación del organismo adulto se requiere la fusión de los discos imaginales para formar una cutícula continua en la cabeza y el tórax, y la de los nidos de histoblastos para formar el abdomen (Fristrom y Fristrom, 1993; Pastor-Pareja *et al.*, 2004).

Los discos imaginales de *Drosophila* están subdivididos en compartimentos, que se definieron originalmente como regiones de cutícula adulta que comparten el mismo linaje celular, de forma que cada compartimento deriva de un grupo de células cuya progenie forma el compartimento completo (García-Bellido *et al.*, 1973; Crick y Lawrence, 1975). La subdivisión más temprana ocurre durante la embriogénesis, y origina los compartimentos anterior (A) y posterior (P). Más tarde, durante el desarrollo larvario, se generan los compartimentos dorsal (D) y ventral (V) (García-Bellido, 1975). En los discos imaginales de ala y halterio, el compartimento posterior se define por la expresión del gen *engrailed* (*en*), mientras que la subdivisión en los compartimentos dorsal y ventral depende de la expresión del gen *apterous* (*ap*) en el compartimento dorsal (García-Bellido *et al.*, 1973; García-Bellido *et al.*, 1976). La expresión de estos genes es suficiente para conferir una identidad genética a las células que los expresan, algo determinante en su desarrollo (García-Bellido, 1975; Kornberg *et al.*, 1985; Cohen *et al.*, 1992; Lawrence *et al.*, 1996; Blair, 1995).

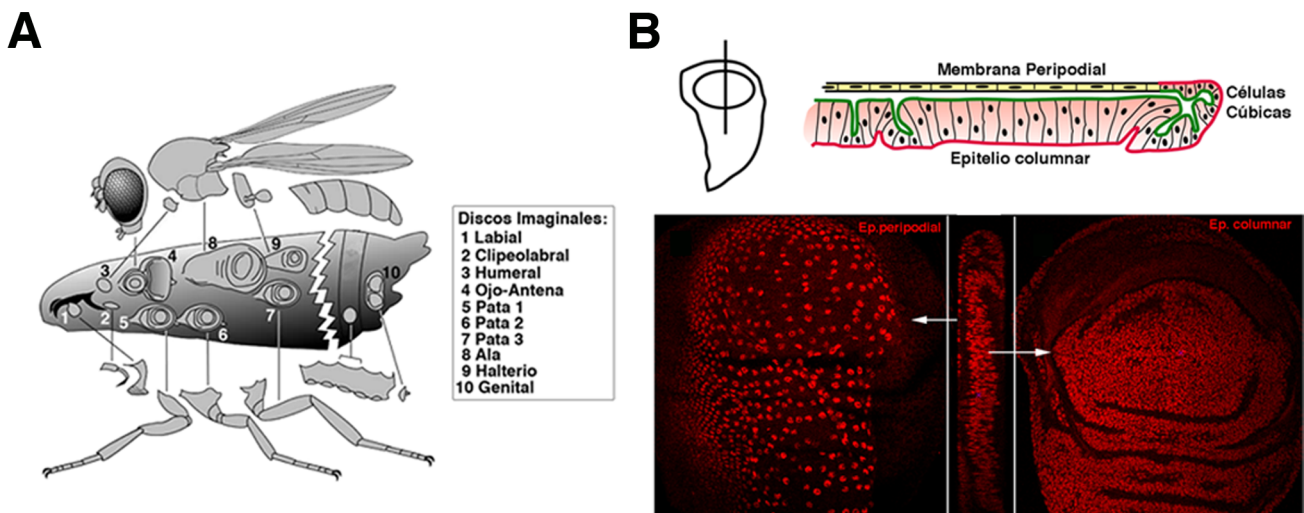


Figura 1 2: Los discos imaginales de *Drosophila melanogaster*. (A) Representación esquemática de los discos imaginales y de las estructuras a las que darán lugar en el individuo adulto. Los discos imaginales aparecen en el interior de la larva, en la parte central de la figura. Sus nombres se indican siguiendo un código de números a la derecha. Modificado de “Imaginal Discs” de Lewis I Held Jr (2005). (B) Representación esquemática del disco imaginal de ala, e imagen de microscopía confocal con tinción nuclear que muestra los dos epitelios que lo forman (peripodial, a la izquierda, y columnar, a la derecha, corte transversal en el centro) (cedido por C. Molnar y J.F. de Celis).

Los discos imaginales constituyen un sistema modelo muy útil para el estudio del crecimiento de estructuras epiteliales, ya que son fáciles de aislar de la larva, y además nos permiten analizar genética y molecularmente la función de distintos genes durante su desarrollo.

4. El desarrollo del ala de *Drosophila melanogaster*

El ala adulta de *Drosophila* está constituida por una bicapa de células que presenta un patrón invariable de 5 venas longitudinales (L1-L5) y 2 venas transversales. Además, contiene distintos elementos sensoriales distribuidos de una forma regular a lo largo del borde de la misma. Cada vena está formada por células muy compactadas y fuertemente pigmentadas que se encuentran separadas por una región de células no pigmentadas que denominamos regiones de intervena (Figura 1 3 B). El ala se forma a partir del disco imaginal mesotorácico dorsal que deriva de unas 20 células que se especifican durante el desarrollo embrionario. Estas células proliferan durante el desarrollo larvario, de modo que el disco imaginal de ala de tercer estadio posee unas 75.000 células

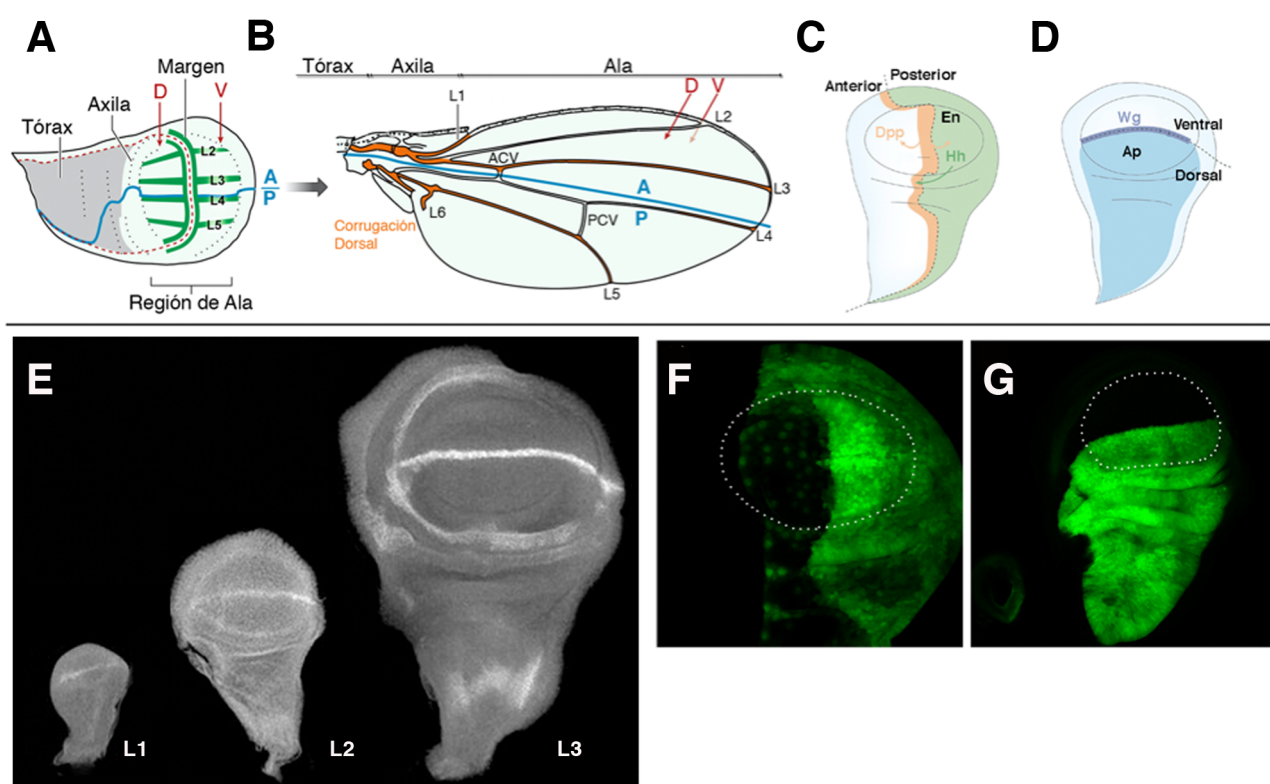


Figura 1 3: Desarrollo del ala de *Drosophila melanogaster*. (A) Esquema del disco imaginal de ala mostrando los bordes del compartimento anterior/posterior (A/P, línea azul) y dorsal/ventral (D/V, línea roja). En verde aparecen marcadas las regiones que darán lugar al margen del ala y las venas L2, L3, L4, L5. También se indican las regiones que darán lugar al tórax o notum, la axila alar y el ala propiamente dicha. (B) Representación del ala adulta, mostrando la localización de las venas longitudinales (L1-L5) y las venas transversales (ACV y PCV). Los compartimentos anterior (A) y posterior (P) aparecen separados por una línea azul. Mediante flechas rojas se indica las superficies dorsal (D) y ventral (V). (C, D) Posición de los compartimentos anterior/posterior (en verde en C) y dorsal/ventral (en azul en D). (C) Las células posteriores expresan el gen *engrailed* (*en*) y el ligando Hedgehog (Hh), que inducen la expresión del gen *decapentaplegic* (*dpp*) (en naranja) en las células anteriores. (D) Las células dorsales expresan el gen *apterous* (*ap*) (en azul); en las células del borde D/V se activa la ruta de Notch, que a su vez activa la expresión del gen *wingless* (*Wg*) (en morado) (Cedido por M.F. Organista y J. F. de Celis). (E) Discos imaginales de ala en el primer, segundo y tercer estadio larvario (L1-L3). Se puede apreciar el incremento de tamaño de los discos como consecuencia de la proliferación celular. En gris se observa la expresión de Wingless, que se expresa en el borde D/V (modificado de Mirth *et al*, 2009). (F, G) Secciones de microscopía confocal mostrando la expresión de los genes *engrailed* (F) y *apterous* (G) marcada por la expresión de la Proteína Fluorescente Verde (GFP). La región putativa de ala se ha señalado con una línea de puntos.

(Figura I 3 E). Durante esta fase del desarrollo, el disco se divide en la región que dará lugar al tórax o notum de la mosca, y la región que dará lugar a ala (Zecca y Struhl, 2002). Dentro de la región de ala del disco imaginal se puede distinguir el territorio situado en la periferia del disco, que dará lugar a la axila alar, y el territorio situado en el centro del disco, que dará lugar al ala propiamente dicha y al margen del ala adulta (Figura I 3 A y B).

Como describimos anteriormente, los discos se subdividen en distintos compartimentos durante su desarrollo. La confrontación de las células de los distintos compartimentos da lugar a la activación de diferentes rutas de señalización que dirigen la proliferación y la supervivencia celular, así como la formación del patrón del ala. De esta forma, en el borde A/P la ruta de señalización de Hedgehog (Hh), que se expresa en el compartimento posterior, induce la expresión de *decapentaplegic (dpp)* en una banda de células en el compartimento anterior (Basler y Struhl, 1994; Raftery *et al.*, 1991; Zecca *et al.*, 1995) (Figura I 3 C y F). La proteína Dpp difunde a lo largo de todo el disco de ala e induce proliferación, además de activar la expresión diferencial de distintos genes necesarios para definir el patrón de vena/intervena que aparece el ala adulta. En el borde D/V la confrontación de células que expresan *apterous* (compartimento dorsal) con aquellas que no lo expresan (compartimento ventral), da lugar a la activación de la ruta de Notch (N) en la región que formará el margen del ala. Esta ruta promueve la activación de *vestigial (vg)* y *wingless (wg)*, que son necesarios para el crecimiento del ala (Couso y Martínez Arias, 1994; Hing *et al.*, 1994; Díaz-Benjumea y Cohen, 1995; Rulifson y Blair, 1995; Lawrence *et al.*, 1996) (Figura I 3 D y G). Durante el desarrollo pupal, el disco de ala evierte gracias a la constricción de la membrana peripodial, y comienza el proceso de diferenciación para dar lugar al ala adulta (Aldaz *et al.*, 2013) (Figura I 3 B).

5. El ciclo celular y el control de la proliferación en *Drosophila melanogaster*

El desarrollo de los organismos pluricelulares depende de numerosos procesos celulares que deben estar regulados y coordinados entre sí. Uno de estos procesos es la proliferación celular. Durante la embriogénesis de *Drosophila*, el ciclo celular ocurre sin que haya crecimiento celular, debido a que en estas etapas tempranas del desarrollo la transcripción aún no se ha iniciado. Así, las primeras 13 divisiones celulares ocurren en un sincitio (los núcleos se dividen en un citoplasma común), en ciclos que sólo constan de las fases de síntesis de ADN (fase S) y división celular (fase M, o mitosis) (Lee y Orr-Weaver, 2003). El agotamiento de componentes maternos, principalmente de la fosfatasa Cdc25/String, condiciona el cambio hacia la celularización y el inicio de la actividad transcripcional del embrión (Edgar y Datar, 1996). El resto de los ciclos celulares de la fase embrionaria ocurren siguiendo un patrón que está genéticamente regulado, y que depende de la disponibilidad de la Ciclina E y la fosfatasa String por parte de las células que se van a dividir (Richardson *et al.*, 1993; Edgar *et al.*, 1994; Knoblich *et al.*, 1994).

Durante el desarrollo larvario, las células progenitoras del futuro individuo adulto, o células imaginales, proliferan mediante un ciclo celular convencional (G1-S-G2-M), en el que están coordinados el crecimiento y la división celular (Lee y Orr-Weaver, 2003) (Figura I 4A). El principal

regulador de la transición G1/S en *Drosophila* es la Ciclina E (Cyc E), que experimenta un pico de activación transcripcional durante la fase G1 que determina la entrada en fase S (Knoblich *et al.*, 1994) (Figura I 4 B). Durante esta misma fase se activa el factor de transcripción dE2F1, que tiene un papel crítico en la transcripción de genes importantes para la replicación del ADN, como RNR2 y PCNA (Duronio *et al.*, 1995). Al igual que en mamíferos, la proteína del Retinoblastoma de *Drosophila* (dRb) es necesaria para la represión de dE2F y, junto con el inhibidor de la Cyc E Dacapo (de Nooij *et al.*, 1996), es necesaria para la salida de la fase G1 (Du y Dyson, 1999; Firth y Baker, 2005). En mamíferos, además de la Cyc E, la Ciclina D (Cyc D) funciona como un sensor que vincula el crecimiento celular y la división, ya que se activa por factores de crecimiento y lleva a cabo la fosforilación e inactivación

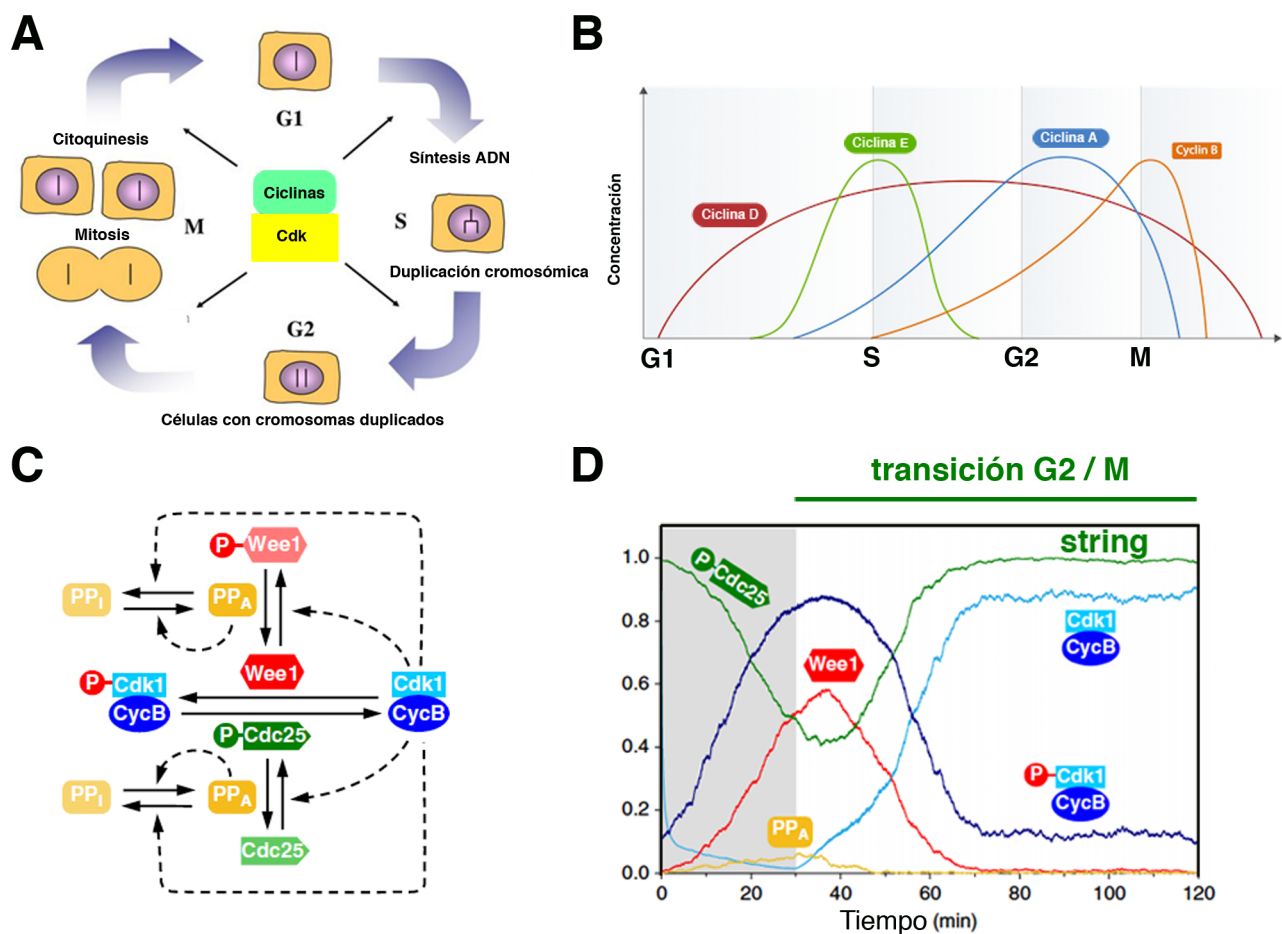


Figura I 4: El ciclo celular en *Drosophila melanogaster*. (A) Esquema que representa las fases del ciclo celular. Al final de la fase G1, se produce un pulso de activación de distintas Ciclinas, que marca la entrada en fase S, durante la cual tiene lugar la replicación del ADN, que conlleva la duplicación de la dotación cromosómica de la célula. Durante la fase G2, la célula se prepara para la división celular. Al final de esta fase las células comienzan la mitosis, mediante la cual se produce la separación de la dotación cromosómica en dos partes iguales, y tiene lugar la separación física de las dos células hijas (citocinesis) (modificado de www.dkfz.de/) (B) Patrón de expresión de las distintas Ciclinas durante el desarrollo del ciclo celular (modificado de en.wikipedia.org/Cyclin_Expression). (C) La desfosforilación y activación del complejo CycB/Cdk1 se produce gracias a la acción de la fosfatasa Cdc25 (en *Drosophila* llamada String), que recoge el grupo fosfato del complejo P-CycB/Cdk1. El proceso reverso, mediante el cual se inactiva el complejo, lo lleva a cabo la quinasa P-Wee1, que fosforila de nuevo al complejo. (D) Durante la transición G2/M, los niveles de String son máximos, y los de Wee1 mínimos. Esta circunstancia conlleva que la forma mayoritaria del complejo CycB/Cdk1 sea la desfosforilada y activa, que permite la entrada en Mitosis. Las figuras B y C han sido modificadas de Kapuy *et al.*, 2009.

de Rb (Meyer *et al.*, 2000; Coqueret, 2002). Por otro lado, Cyc D secuestra a diversos inhibidores de la actividad de Cyc E/Cdk2 (Coqueret, 2002), por lo que favorece el paso a la fase S. En *Drosophila*, la Cyc D regula el crecimiento celular, pero no es crucial durante la transición G1/S (Datar *et al.*, 2000).

Durante la fase de replicación del ADN, o fase S, se ha observado que la maquinaria empleada por las células de *Drosophila* está altamente conservada en todos los eucariotas, y muchos de sus reguladores se transcriben bajo el control del factor dE2F (Lee y Orr-Weaver, 2003). Después de la duplicación del material genético tiene lugar la fase G2 del ciclo, que es el momento en el que se duplican muchos de los orgánulos celulares y las células se preparan para la división. La decisión de entrar en mitosis (fase M) depende del estado de fosforilación del complejo Ciclina B/Cdk1 (CycB/Cdk1) (Lee y Orr-Weaver, 2003). Dos enzimas con actividades opuestas controlan la fosforilación de Cdk1. La quinasa Wee 1 regula negativamente la actividad del complejo mediante la fosforilación de Cdk1, mientras que las fosfatasas String (Stg) y Twine (Twe) eliminan el grupo fosfato inhibitor, activando el complejo y por lo tanto promoviendo la entrada en mitosis (Dunphy y Kumagai, 1991; Edgar y Datar, 1996) (Figura I 4 C). Al final de la fase G2, la expresión de *stg* es máxima, de manera que la forma parcialmente desfosforilada del complejo Cyc B/Cdk1 es la mayoritaria, hecho que determina la entrada en mitosis (Figura I 4 D) (Edgar *et al.*, 1994; Kapuy *et al.*, 2009).

Mientras que los complejos de Ciclinas/Cdk son necesarios para que la mitosis tenga lugar, su degradación es necesaria para la salida de la mitosis y el retorno a la interfase. La degradación de los complejos de Ciclinas/Cdk y otros reguladores del ciclo celular la lleva a cabo el complejo APC/C (*Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*) que ubiquitina los citados reguladores del ciclo para su degradación en el proteasoma (Peters, 2002).

5.1. La fosfatasa String durante el desarrollo de los discos imaginales

La función de *stg* es esencial para la entrada en mitosis, como demuestra el hecho de que mutaciones de falta de función en *stg* causan la detención del ciclo en G2, tanto en embriones como en discos imaginales (Edgar y O'Farrell, 1989; Neufeld *et al.*, 1998a), mientras que su expresión ectópica conduce a las células de la fase G2 a entrar rápidamente en mitosis (Milán *et al.*, 1996; Neufeld *et al.*, 1998a). Así pues, la expresión de Stg va a determinar el momento de entrada en mitosis de las células que se encuentran en G2. Dado que el ARNm de *stg* es muy inestable (dura 15 minutos en la célula) y su proteína se degrada al final de la mitosis, la expresión de *string* depende mayoritariamente de su control transcripcional (Edgar *et al.*, 1994; Edgar y Datar, 1996). En los discos de ala, *stg* se expresa en grupos de células distribuidos al azar, que reflejan las oscilaciones del ciclo celular. Durante el tercer estadio larvario, además, se pueden distinguir altos niveles de expresión de este gen a lo largo del borde D/V del disco. La salida del ciclo celular que ocurre al final del desarrollo larvario está acompañada por una reducción de la expresión de *stg* (Milán *et al.*, 1996; Neufeld *et al.*, 1998a).

La regulación transcripcional de *stg* está controlada por una región reguladora que comprende las 40 Kb anteriores al lugar del inicio de su transcripción. En ella, se han caracterizado

múltiples elementos reguladores que reproducen el complejo patrón de expresión de *stg* durante el desarrollo embrionario y del sistema nervioso larvario (Lehman *et al.*, 1999). Si bien ninguno de estos fragmentos reguladores reproduce el patrón de expresión de *stg* en los discos imaginales, se ha encontrado que existen elementos reguladores situados entre -1 y +5 Kb que son importantes para la función de *stg* durante el desarrollo de los discos. Esta propuesta se basa en el hecho de que la letalidad celular observada al inducir clones de recombinación mitótica que originan células mutantes para *stg*, es parcialmente rescatada por un transgén que contiene la región comprendida entre -1 y +5 Kb (*stg* 6.0). Estos elementos reguladores probablemente se encuentran embebidos en la zona promotora mínima de *stg*, que ocupa las 0,7 Kb situadas antes del inicio de la transcripción (Lehman *et al.*, 1999). Por otro lado, cuando se generaron clones de falta de función de *stg* combinados con el transgén *stg* 6.0 y se les dio una ventaja proliferativa utilizando la técnica *Minute* (Simpson y Morata, 1981), se obtuvieron clones de gran tamaño que no parecían tener ninguna restricción para crecer (Lehman *et al.*, 1999). Este hecho pone de manifiesto que estas células mutantes están sometidas a la acción de la competición celular, de modo que las células silvestres que rodean al clon deficiente para *stg* limitan su crecimiento.

Comprender cómo se regula la expresión de los distintos factores que controlan el ciclo celular es fundamental para entender cómo se controla la proliferación durante el desarrollo. Uno de los objetivos de esta Tesis es el análisis de distintos factores que controlan la expresión de algunos de los elementos reguladores del ciclo celular.

6. La familia de proteínas bHLH

La familia de factores de transcripción “basic Helix-Loop-Helix” (bHLH) está constituida por un conjunto de moléculas reguladoras que controlan multitud de procesos celulares en distintos organismos, desde las levaduras hasta los humanos (Atchley y Fitch, 1997). En los metazoos, las proteínas de la familia bHLH controlan procesos tan diversos como son la determinación sexual, la neurogénesis, la miogénesis, la hematopoyesis y el desarrollo pancreático. Además, estas proteínas están íntimamente ligadas al control de la diferenciación celular durante el desarrollo, creando restricciones de linaje (revisado en Massari y Murre, 2000). Esta familia de proteínas se caracteriza por poseer un dominio “HLH” que les permite formar homo y heterodímeros entre ellas o con otras proteínas no-bHLH. Por otro lado, contienen un dominio básico que les confiere la capacidad de unirse al ADN (Ellenberger *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1994) (Figura I 5 A).

La familia bHLH se ha subdividido en diferentes clases, atendiendo a su patrón de expresión, su capacidad de formar dímeros y las características de su unión al ADN. La clase I, compuesta por las llamadas proteínas “E”, está representada en vertebrados por las diferentes variantes transcripcionales de la proteína E2A (E12, E47 y E2-5/ITF1), y las proteínas E2-2/ITF2 y HEB/HTF4, y en *Drosophila* por la proteína Daughterless (Da) (Henthorn *et al.*, 1990; Aronheim *et al.*, 1993a; Aronheim *et al.*, 1993b; Cronmiller y Cline, 1987; Caudy *et al.*, 1988b). Estas proteínas se expresan de forma ubicua en múltiples tejidos y pueden formar homo y heterodímeros. La clase II está compuesta por proteínas

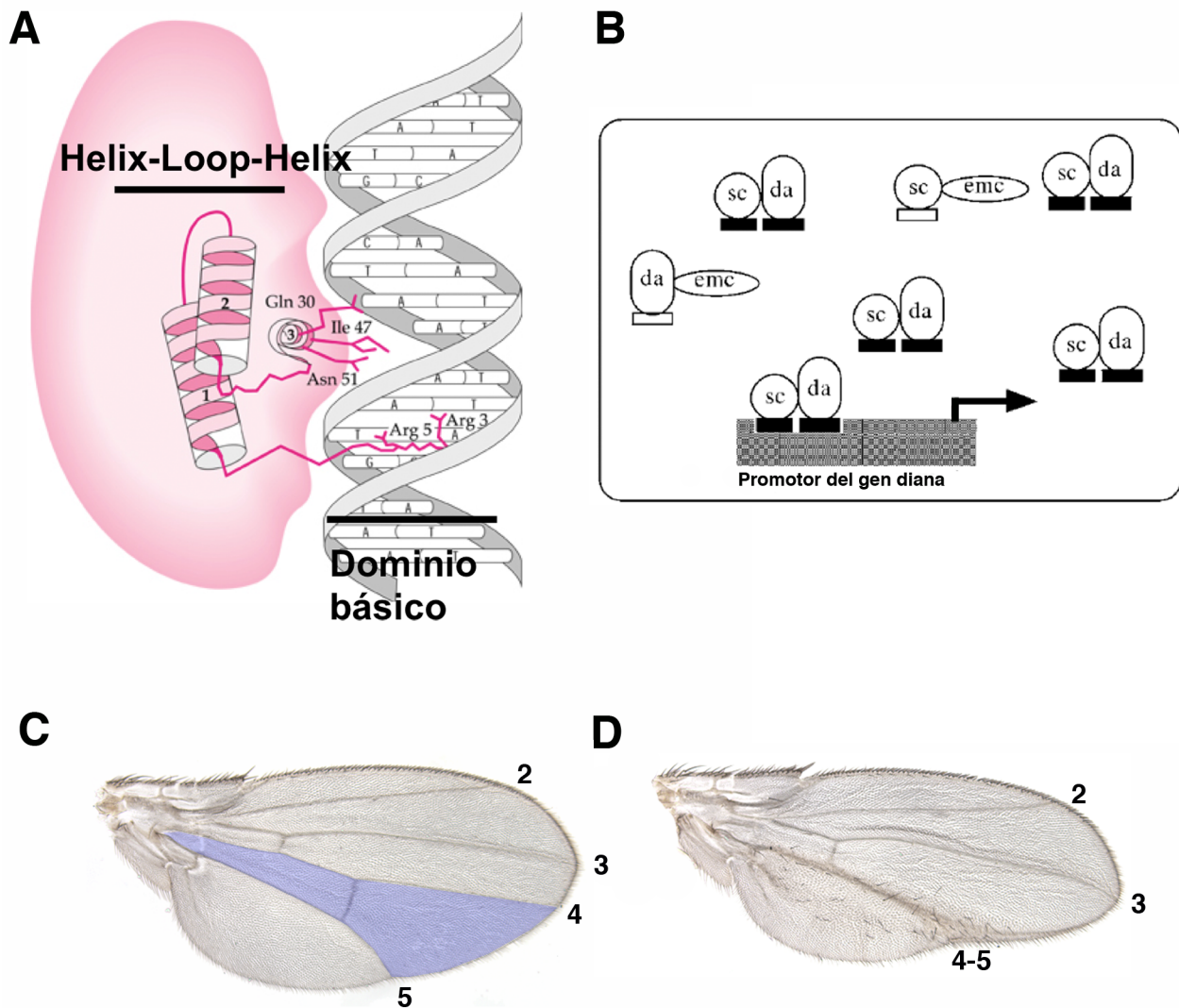


Figura 1 5: Las proteínas bHLH en *Drosophila melanogaster*. (A) Esquema que representa los dos elementos principales que definen a la familia bHLH: el dominio Helix-Loop-Helix, que les sirve para su interacción con otras proteínas, y el dominio básico, que les permite unirse al ADN y modificar la transcripción de genes diana. (B) Esquema que representa la dinámica de las proteínas bHLH Scute (Sc), Daughterless (Da) y Extramacrochaetae (Emc). La formación de heterodímeros entre Da y Sc conlleva la activación de genes diana, mediante la unión del complejo al ADN. La HLH represora Emc se une a Da y/o a Sc, generando una conformación incapaz de unirse al ADN, que inhibe las funciones del complejo Da/Sc (tomado de Campuzano, S. (2001)). (C-D) Alas de *Drosophila melanogaster*, que muestran el fenotipo que ocasionan los clones de falta de función de *emc* combinados con la técnica *Minute* (*emc¹ M⁺*). En el ala control (C) se observa el patrón de las venas del ala (señaladas con números del 2 al 5), y el espacio que ocupa la región de intervena 4-5 (coloreada en azul). En el ala mutante (D) el clon de falta de función de *emc* ocupa la región de intervena 4-5, y ocasiona la desaparición del mencionado territorio, provocando la unión física de las dos venas (4-5), así como la aparición de órganos sensoriales (quetas) (Imágenes cedidas por J.F. de Célis).

que se expresan con un patrón espacio-temporal determinado, y está representada en vertebrados por proteínas como MyoD, Miogenina y NeuroD/BETA2, y en *Drosophila* por factores como Twist, Atonal y el complejo Achate-Scute. Estas proteínas juegan un papel fundamental en la adquisición de determinados destinos celulares (Olson, 1990; Weintraub *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1996; Spicer *et al.*, 1996; Villares y Cabrera, 1987; Campuzano *et al.*, 1985; Alonso y Cabrera, 1988; Domínguez y

Campuzano, 1993; González *et al.*, 1989; Chen y Chien, 1999). Funcionan formando heterodímeros con las bHLH de clase I, de modo que los miembros de la clase II aportan la especificidad temporal y de tejido, mientras que los de clase I se unen al ADN y regulan la transcripción. Dado que la dimerización es esencial para mantener la actividad transcripcional de estos complejos *in vivo*, las proteínas que inhiben su formación se consideran reguladores negativos de la acción de las bHLH mencionadas. Así, la clase V, compuesta por proteínas con dominio de dimerización HLH pero que carecen del dominio básico, actúan uniéndose a otras bHLH (principalmente de las clases I y II) secuestrándolas e impidiendo su unión al ADN. En vertebrados, las bHLH de clase V son las llamadas proteínas Id (*Inhibitor of differentiation*), compuestas por 4 miembros (Id1-4; Benezra *et al.*, 1990), mientras que en *Drosophila* están representadas por la proteína Extramacrochaetae (Emc) (Botas *et al.*, 1982; García-Alonso y García-Bellido, 1988; Ellis *et al.*, 1990; Garrell y Modolell, 1990).

Las bHLH de clase III se caracterizan por poseer un dominio LZ adyacente al dominio HLH. Los principales representantes de esta clase son los factores de transcripción Myc (Henthorn *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 1993; Murre *et al.*, 1989a). Estas proteínas forman dímeros con las bHLH de clase IV, como Mad, Max y Mxi (Blackwood y Eisenman, 1991; Ayer *et al.*, 1993; Zervos *et al.*, 1994). La clase VI se caracteriza por la presencia de un residuo de prolina en su región básica, y a ella pertenecen las proteínas de *Drosophila* Hairy, Deadpan y el complejo Enhancer of Split (E(spl)) (Rushlow *et al.*, 1989; Bier *et al.*, 1992; Klambt *et al.*, 1989). Por último, la clase VII presenta un dominio bHLH-PAS, y está compuesta por miembros como HIF1 α en vertebrados, y Single-minded y Period en *Drosophila* (Crews, 1998).

Entre los distintos miembros que conforman la familia de las bHLH existen tanto activadores transcripcionales, como son las proteínas E, Myc, Twist, y Achaete-Scute, como inhibidores de la transcripción, como los componentes del complejo E(spl), Hairy o Deadpan. Estos últimos realizan su función represora uniéndose a co-represores, como Groucho o Sin3A, que reclutan enzimas deacetilasas que inhiben la transcripción (Fisher y Caudy, 1998; Chen *et al.*, 1999; Schreiber-Agus *et al.*, 1995). En una misma célula pueden convivir varios de los factores bHLH descritos, que interaccionan entre sí de forma altamente dinámica. Así pues, la regulación de la expresión de estos factores va a determinar el tipo de respuesta celular.

6.1. *Extramacrochaetae* es necesario para múltiples funciones durante el desarrollo

El gen *extramacrochaetae* (*emc*) se descubrió debido a su capacidad para antagonizar la acción de los llamados “genes proneurales” (Botas *et al.*, 1982). Su nombre proviene de su fenotipo de falta de función, que consiste en la aparición de un número mayor de quetas u órganos sensoriales. La aparición de estos elementos sensoriales, necesarios para la interacción de *Drosophila* con su entorno, depende de la actividad de las bHLH de clase II del complejo *achaete-scute* (*ac-sc*). Los genes de este complejo se expresan durante el desarrollo imaginal en posiciones concretas para especificar a la Célula Madre Sensorial (SMC), que diferencia dando lugar a cada órgano sensorial (Cubas *et al.*, 1991; Skeath y Carroll, 1991). Dado que los genes del complejo *ac-sc* confieren a las

células que los expresan el destino neural, se los ha denominado como “proneurales” (Romani *et al.*, 1989). El patrón de expresión de los genes proneurales en el disco imaginal de ala es altamente complementario al de *emc* (Cubas y Modolell, 1992), de modo que se ha propuesto que las células que se convierten en SMC son aquellas que expresan altos niveles de *ac-sc* y bajos niveles de *emc*. Así, *emc* se encargaría de mantener a las células en estado indiferenciado, de manera que sólo aquellas células cuyos niveles de *emc* fueran muy bajos o inexistentes podrían activar los genes necesarios para iniciar la diferenciación neuronal (Garrell y Campuzano, 1991; Cubas y Modolell, 1992). A nivel molecular, algunos de los factores codificados por los genes del complejo *ac-sc* interaccionan con la bHLH de clase I Daughterless (Da), de manera que se forman heterodímeros que se unen al ADN. En este contexto celular, Emc puede secuestrar a Da y a algunos de los productos del complejo *ac-sc*, impidiéndose la formación de los heterodímeros Ac-Sc/Da, lo que inhibiría la adquisición del destino neural (Garrell y Campuzano, 1991; Campuzano, 2001) (Figura 1.5 B).

El papel de Emc como represor de genes proneurales no se limita a la formación de las quetas, ya que ejerce un papel similar durante el desarrollo del ojo de *Drosophila*. En el disco de ojo, Emc se expresa a altos niveles en la región anterior al surco morfogenético, que es una región compuesta por células indiferenciadas que proliferan activamente. La función de Emc en estas células es necesaria para reprimir la actividad de la bHLH de clase II Atonal, que forma heterodímeros con Da, y que juega un papel fundamental en el inicio de la especificación de los fotorreceptores que constituyen la retina del ojo de *Drosophila* (Jarman *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995). Tras el paso del surco morfogenético, *emc* es reprimido transcripcionalmente por la ruta de señalización de Notch, lo cual permite que se inicie la diferenciación neuronal de los fotorreceptores (Baonza y Freeman, 2001).

La función de Emc se requiere durante otros procesos del desarrollo. El ARNm de *emc* está presente en el cigoto (provisto de forma materna) (Cubas *et al.*, 1994), ya que está implicado en la determinación sexual del individuo (Younger-Shepherd *et al.*, 1992). Posteriormente, durante el desarrollo embrionario, Emc se necesita para la especificación de múltiples destinos celulares (Ellis, 1994), entre los que cabe destacar su papel en el desarrollo de estructuras tubulares como los túbulos de Malpigio (que constituyen el sistema excretor de *Drosophila*) y el sistema traqueal (que forma el sistema respiratorio) (Cubas *et al.*, 1994). Además, es necesario para el correcto desarrollo de los tejidos derivados del mesodermo embrionario, de modo que los mutantes de *emc* presentan profundos defectos en el desarrollo muscular (Cubas *et al.*, 1994).

Durante el desarrollo larvario y pupal, Emc se expresa en el ala a altos niveles en las regiones de intervena (Baonza y García-Bellido, 2000). Además, se ha observado que los clones de falta de función de *emc* realizados con un alelo hipomorfo son pequeños y alargados, y se localizan sobre las venas o en las regiones centrales de las intervenas, llegando a producir la diferenciación de venas ectópicas (García-Alonso y García-Bellido, 1988; de Celis *et al.*, 1995; Baonza y García-Bellido, 1999). Ambas circunstancias sugieren un posible papel de Emc en la especificación de las venas. También se ha propuesto que *emc* tiene una función en la definición del grosor final de las mismas. Así, se ha observado que tanto Emc como la bHLH E(spl)m β son activadas por la ruta de Notch en las regiones adyacentes a las venas, donde su función sería necesaria para definir la anchura final de la

vena (Baonza y García-Bellido, 2000). Durante el desarrollo del disco de ala, la ruta de Notch activa la expresión de *emc* (Baonza y García-Bellido, 2000). Puesto que tanto las células deficientes para *Notch* como para *emc* presentan dificultades para crecer (de Celis y García-Bellido, 1994) y dado que la expresión de *emc* es regulada por la ruta de Notch, es posible que Emc pudiera intervenir en la función de esta ruta en el control de la proliferación celular.

6.1.1. Función de *Extramacrochaetae* en el control de la proliferación

Como acabamos de describir, Emc tiene múltiples funciones durante el desarrollo (revisado en Campuzano, 2001). Entre ellas se ha demostrado que la función de *emc* es imprescindible en el mantenimiento del balance entre proliferación y diferenciación. Diversos resultados apoyan el requerimiento de *emc* para regular este proceso. Así, se ha descrito que clones de alelos nulos de *emc* son letales celulares, tanto en disco imaginal de ala como en el de ojo (de Celis *et al.*, 1995; Bhattacharya y Baker, 2012). Además, se ha observado que los clones de células mutantes para el alelo hipomorfo *emc*¹ proliferan mucho menos que los controles. Cuando a las células mutantes para *emc*¹ se les otorga una ventaja proliferativa haciéndolas homocigóticas para *Minute*⁺ (Simpson y Morata, 1981) en un entorno *Minute*⁻ heterocigótico, éstas ocupan regiones mayores de tejido, de modo que abarcan regiones completas de intervénula. En este caso, los clones daban lugar a la desaparición completa de regiones de intervénula, lo que ocasionaba la fusión de las venas adyacentes (de Celis *et al.*, 1995) (Figura I 5 C-D). Estos hallazgos indican que, si bien los clones deficientes para *emc* están sometidos a competición celular, ésta no explica por sí sola los efectos deletéreos de *emc* sobre la proliferación. Si bien parece claro que *emc* juega un importante papel en promover la proliferación celular, los mecanismos moleculares implicados en esta función se desconocían hasta ahora.

6.1.2. Las proteínas Id, ortólogos de *Extramacrochaetae* en vertebrados

Los ortólogos de Emc en vertebrados son un grupo de cuatro factores conocidos como Id. Su nombre fue asignado por R. Benezra, que las llamó Id por “Inhibitor of DNA binding”, describiendo su función molecular como represoras de otras bHLH (Benezra *et al.*, 1990). Comúnmente, estos factores han sido llamados “Inhibitor of Differentiation”, en alusión a su función en el mantenimiento de las células en estado indiferenciado. Durante el desarrollo, las proteínas Id se expresan en múltiples órganos y tejidos de forma no excluyente, de modo que en la misma célula pueden expresarse varios de los miembros de esta familia. Debido a la similitud estructural de estas proteínas, se ha descrito que en algunos casos existe redundancia funcional, por lo que es necesario eliminar simultáneamente a más de uno de los miembros de la familia para visualizar sus fenotipos de falta de función (Lyden *et al.*, 1999). En ocasiones, resulta complicado separar sus funciones como promotoras de la proliferación y como inhibidoras de la diferenciación. Su función sobre la proliferación celular se hace más evidente durante la gametogénesis o en el desarrollo del sistema inmune, mientras que durante el desarrollo

del sistema nervioso su papel principal está relacionado con el mantenimiento de los precursores neuronales en estado inmaduro, permitiendo su proliferación hasta haber alcanzado un tamaño poblacional suficiente para iniciar la diferenciación (revisado en Yokota, 2001). La desregulación de los niveles de las proteínas Id produce cambios de destino celular que afectan mayoritariamente a los linajes de células sanguíneas y neuronales (Yokota *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2000; Hacker *et al.*, 2003). Existe una amplia variedad de factores de transcripción a los que pueden unirse los Id, aparte de los factores de la familia bHLH, siendo los más conocidos los miembros de las familias ETS y PAX (Yates *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2001). Además, se ha visto que pueden unirse a proteínas que no son factores de transcripción. La unión de Id2 a la proteína del Retinoblastoma (Rb), a la que antagoniza impidiendo que ésta inhiba al factor E2F, es el caso mejor estudiado acerca de cómo los Id afectan de manera directa a la progresión del ciclo celular (Iavarone *et al.*, 1994; Lasorella *et al.*, 2000). En *Drosophila*, se ha observado que Rb regula a E2F durante el desarrollo del ojo, si bien no se ha encontrado que se unan físicamente como lo hacen en vertebrados (Popova *et al.*, 2011).

Durante los últimos años, las proteínas Id han cobrado gran relevancia debido a su papel en la progresión tumoral. Se han encontrado altos niveles de combinaciones variables de las Id en múltiples tipos de cánceres humanos. Estas alteraciones están asociadas a la pérdida del estado de diferenciación celular (anaplasia), lo que da lugar a un aumento de la malignidad tumoral y a un mal pronóstico de la enfermedad (Lasorella *et al.*, 2001; Iavarone y Lasorella, 2006). Además, se ha observado que las Id están implicadas en la habilidad de las células tumorales para invadir tejidos y metastatizar, promoviendo la formación de nuevos vasos sanguíneos (Perk *et al.*, 2005). Su presencia aberrantemente elevada en las células tumorales las convierte en potenciales dianas para desarrollar nuevas estrategias en la terapia contra el cáncer (Fong *et al.*, 2004; Tsuchiya *et al.*, 2005; Nieborowska-Skorska *et al.*, 2006).

6.2. La proteína *Daughterless* y sus ortólogos en vertebrados, las proteínas “E”, en el control de la proliferación celular

Daughterless es el único representante de las bHLH de clase I en *Drosophila*. Se encuentra presente desde el inicio del desarrollo, heredado de forma materna en el cigoto de *Drosophila*, donde ejerce un importante papel en la determinación sexual (Cline, 1976). Las hembras deficientes para *da* no tienen progenie femenina debido a que la proteína de origen materno se necesita durante la embriogénesis para la activación del gen *sex lethal (sxl)*, cuya función es fundamental para que se produzca la compensación de dosis cromosómica en las hembras y para el desarrollo de los tejidos somáticos femeninos (Lucchesi y Skripsky, 1981; Cline, 1983; Gergen, 1987). Durante la fase zigótica del desarrollo embrionario, *Da* promueve la diferenciación de los precursores neuronales, especialmente durante la formación del sistema nervioso periférico (Caudy *et al.*, 1988; Vaessin *et al.*, 1994), donde se ha observado que activa genes relacionados con el ciclo celular (Hassan y Vaessin, 1997). Asimismo, durante la miogénesis somática *Da* forma heterodímeros con la bHLH de clase II Twist, reprimiendo la transcripción de genes necesarios para la diferenciación muscular (Castanon *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2008). La ya mencionada unión entre los productos codificados

por algunos de los genes del complejo *ac-sc* y Da promueve la definición de los órganos sensoriales, incluyendo las células sensoriales del margen del ala (Dambly-Chaudière *et al.*, 1988; Cabrera y Alonso, 1991, Jafar-Nejad *et al.*, 2006). Da es además necesario para la formación de los folículos ováricos durante el desarrollo larvario (Cummings y Cronmiller, 1994). Además, como se mencionó anteriormente, Da se requiere durante el desarrollo neuronal en el ojo, ya que forma heterodímeros con Atonal para especificar a la célula fotorreceptora R8, que inicia el reclutamiento de las células que componen cada omatidio del ojo compuesto de *Drosophila* (Brown *et al.*, 1996). Como se puede observar, las funciones de Da durante el desarrollo han sido ampliamente estudiadas. Sin embargo, no se conoce si ejerce algún papel regulando la proliferación celular durante las fases de crecimiento de *Drosophila*.

Recientemente, se ha descrito la existencia de un bucle de regulación entre Evc y Da, que además está conservado en varios tipos celulares de vertebrados. Según este modelo, Da se auto-regula de forma positiva para mantener sus niveles, y a su vez aumenta la expresión de su propio represor, Evc. Así, Evc actuaría controlando el exceso de activación de Da (Bhattacharya y Baker, 2012). Esto implica que cambios en los niveles de expresión de *evc* producidos por la actividad de distintas rutas de señalización, podrían estar modulando los niveles de Da. La estrecha relación entre estas dos proteínas está conservada en vertebrados, donde las bHLH de clase I (E2A, HEB y E2-2) que funcionan en forma heterodimérica con otras bHLH, son inhibidas por las proteínas Id (Rothschild *et al.*, 2006). Las funciones de las proteínas “E” coinciden con las descritas para Daughterless, de modo que su interacción con otras proteínas (fundamentalmente bHLH de clase II) favorece la entrada en diferenciación de varios tipos celulares, contribuyendo al desarrollo de tejidos musculares, neuronales y pancreáticos (Weintraub *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1995; Naya *et al.*, 1995). Además de su papel como reguladores de la expresión génica específica de tejido, se ha propuesto que las proteínas “E” tienen un papel en la progresión del ciclo celular. Las conclusiones sobre su función en este aspecto son variadas, ya que en algunos trabajos se ha definido su papel como inhibidoras del crecimiento al impedir la entrada en fase S (Peverali *et al.*, 1994; Funato *et al.*, 2001; Engel y Murre, 2004), mientras que otros autores han propuesto que estas proteínas funcionan como promotoras de la proliferación, estimulando la expresión génica de componentes del ciclo celular (Zhao *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2004). Parte de las dificultades para definir la función de estas proteínas en el control de la proliferación celular en vertebrados se deben a la redundancia funcional que existe entre ellas. Así pues, conocer el papel de Daughterless sobre la proliferación y la progresión del ciclo celular en *Drosophila* podría ayudar a comprender algunas de las funciones de sus ortólogos en vertebrados.

7. Caracterización de nuevos factores que interaccionan con Evc: el gen CG34422 de *Drosophila melanogaster*

Otro de los objetivos de esta Tesis ha sido caracterizar nuevos factores que interaccionen con Evc y que nos puedan ayudar a entender sus funciones en el desarrollo. Uno de estos factores es

el producto del gen *CG34422* (ver Resultados Segunda Parte), el cual aún no ha sido caracterizado en *Drosophila*. Su estructura molecular predice que se trata de una proteína de unión al ADN, que comparte características con otros factores que modifican la estructura de la cromatina, alterando la transcripción de genes diana. Cabe pensar que el producto de este gen podría ser un mediador de las funciones de Emc durante el desarrollo de *Drosophila*. A continuación, describiremos las principales características del gen *CG34422*, así como de sus ortólogos en vertebrados, y los antecedentes que se conocen sobre su posible función.

7.1. Características moleculares de *CG34422*

El gen *CG34422* tiene un tamaño de unas 12 Kb y está localizado en el cromosoma X, en la región citogenética 17E1. Posee dos exones principales que codifican para una proteína de 259,5 KDa. Actualmente, existen dos posibles transcritos descritos para este gen. El primero, llamado *CG34422-RD* contiene toda la secuencia codificante del gen (8079 nucleótidos), y el segundo, llamado *CG34422-RC*, la parte correspondiente al segundo exón (5984 nucleótidos) (Figura R1 C, Flybase). En la región codificada por el primer exón, se encuentran varios dominios conservados de interés, que se detallan a continuación (en dirección 5'-3') (Figura I 6, tomada de la base de datos INTERPRO):

- **Dominio Chromo-Domain y Chromo-Domain-like:** están implicados en el reconocimiento de colas de histonas con Lisinas metiladas. Se descubrieron en proteínas modificadoras de la variegación en *Drosophila*, que modifican la estructura de la cromatina hacia heterocromatina, produciendo represión génica. Están presentes en conocidos modificadores de la cromatina, como las proteínas del grupo Polycomb, la proteína Heterochromatin Protein 1 (HP1) y varias Helicasas y Metil-transferasas.
- **Dominio ARID/BRIGHT:** dominio de unión al ADN. Las proteínas que lo contienen se unen principalmente a zonas ricas en A/T, aunque no existe una región de unión consenso. Estas proteínas son frecuentemente modificadores de la cromatina, que poseen funciones en el control del ciclo celular y la proliferación.
- **Dominio Tudor:** se encuentra en proteínas que se unen al ARN, en las que sirve de lugar de anclaje para interactuar con el ADN.
- **Dominio RBB1NT:** dominio específico de las proteínas de la familia Retinoblastoma Binding Protein 1 (RBP 1/2) de humanos, que se encuentra siempre en posición 5' al dominio ARID/BRIGHT. En *Drosophila*, el *CG34422* es el único gen que posee esta región.

Se ha propuesto que el gen ortólogo de *CG34422* en humanos es el gen *rbp2*, también llamado *arid4b* (Flybase). La proteína codificada por este gen forma parte de un complejo multiproteico llamado Sin3A, que en vertebrados funciona como modificador del estado de acetilación de la cromatina. En *Drosophila*, el gen *CG34422* se ha clasificado ontológicamente como parte del complejo proteico Sin3A de *Drosophila* (*Sin3A Type-complex*, Flybase), de modo que el gen humano y el de *Drosophila* podrían compartir funciones biológicas. En la línea de esta asignación, el programa

PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) sitúa a *CG34422* como parte de la familia “*RBP-related proteins*”.

7.2. Las proteínas de la familia ARID

Las proteínas que contienen el dominio ARID (del inglés “*AT rich interaction domain*”) regulan la estructura de la cromatina y la expresión génica. Están evolutivamente conservadas desde hongos a metazoos, si bien aún no se han encontrado en el reino vegetal (Kortschak *et al.*, 2000). Este motivo se identificó inicialmente en 4 proteínas reguladoras: el gen *bright* de ratón, los genes *mrf1* y *mrf2* de humanos, y el gen *dead ringer (dri)* de *Drosophila melanogaster* (Gregory *et al.*, 1996). Posteriormente se incluyeron otros genes como los genes de mamífero *jumonji*, *smcX* y *smcY*, y los codificantes para las Retinoblastoma Binding Proteins (*rbp1* y *rbp2*) (Fattaey *et al.*, 1993), ortólogos en vertebrados del gen *CG34422* de *Drosophila*. También pertenecen a este grupo los componentes de la familia de reguladores de la cromatina SWI/SNF, como la proteína Swi1 de *Saccharomyces cerevisiae*, y sus ortólogos en humanos *p270*, y en *Drosophila*, *osa* (miembro del grupo Trithorax) (Vázquez *et al.*, 1999).

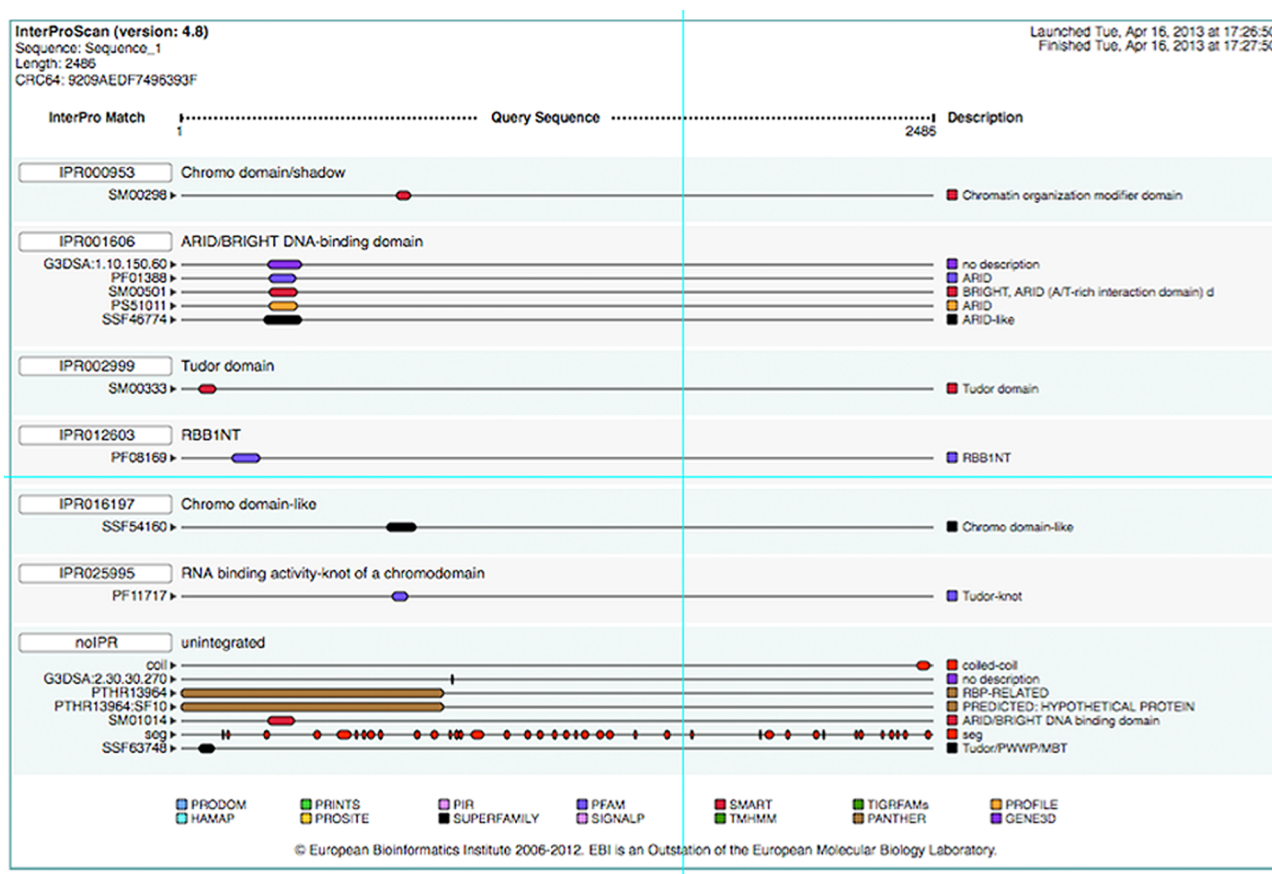


Figura I 6: Dominios conservados del producto del gen *CG34422*. Imagen obtenida de la base de datos InterPro, que recopila la información recogida en otras bases de datos (representadas por colores, en la parte inferior de la imagen). Los dominios conservados encontrados en el análisis de la secuencia proteica del *CG34422* son: *Chromo domain/Shadow*, *ARID/BRIGHT DNA binding domain*, *Tudor domain*, *RBB1NT*, *Chromo domain-like* y *Tudor-Knot*.

El dominio ARID de unión al ADN no es específico de secuencia, aunque algunos miembros de este grupo de proteínas poseen un sitio de unión conocido (Kortschak *et al.*, 2000).

Respecto a sus funciones biológicas, las proteínas de este grupo son fundamentales para la embriogénesis. Así, mutaciones en el gen *dead ringer* de *Drosophila* son letales embrionarias y presentan severos defectos en la especificación de los ejes A/P y D/V (Shyala *et al.*, 1999). Los ratones mutantes para el gen *jumonji* son también letales embrionarios y presentan severos defectos en su organogénesis (Takeuchi *et al.*, 1995). El gen *osa* de *Drosophila* es necesario para el mantenimiento de la segmentación, ya que se requiere para la correcta expresión de genes homeóticos, como el gen *antennapedia* (Vázquez *et al.*, 1999). Debido a su papel como modificador de la cromatina, las mutaciones en el gen *osa* funcionan como supresoras de las mutaciones del grupo Polycomb (Kennison y Tamkun, 1988).

7.3. Papel de Arid4a-b en la progresión del ciclo celular en vertebrados

La proteína Rbp1/Arid4a se une, junto con el factor de transcripción E2F, a un dominio concreto de la proteína del Retinoblastoma fosforilada (pRb) denominado “*pocket domain*”. Rbp1 posee en su extremo carboxilo-terminal una región de secuencia LxCxE mediante la cual se une a este dominio de pRb. Como hemos descrito anteriormente, tanto E2F como pRb son fundamentales para regular la división celular, ya que controlan la transición G1/S durante el ciclo celular. Las mutaciones en el gen que codifica para la proteína del Retinoblastoma dan lugar a la formación de multitud de tipos de cáncer ya que, cuando esta proteína pierde su habilidad para reprimir al factor de transcripción E2F, las células crecen de forma descontrolada (Dick y Rubin, 2013). Se ha encontrado que, además del modelo clásico mediante el cual pRb secuestra al factor E2F para inhibir su función, el complejo formado por pRb, E2F y Rbp1 puede regular transcripcionalmente a E2F uniéndose al “dominio de transactivación” presente en la región promotora de este gen. Una vez unido, este grupo de proteínas puede unirse al complejo modificador de la cromatina Sin3A (Lai *et al.*, 2001; Zhang y Dean, 2001). Este complejo está encargado del reclutamiento de enzimas deacetilasas (como HDAC 1 y 2) (Fleischer *et al.*, 2003) que deacetilan el promotor del factor E2F, cerrando la cromatina e impidiendo su transcripción. Este mecanismo es esencial como elemento de control de la proliferación, ya que actúa de forma directa sobre el estado de apertura o cierre transcripcional del promotor de E2F.

La isoforma Rbp2/Arid4b posee alta homología con la isoforma Rbp1/Arid4a, sin embargo, Rbp2 carece del dominio LxCxE, imprescindible para la unión a pRb. Se piensa que esta isoforma podría funcionar como dominante negativo, compitiendo por la unión de Rbp1 a pRb (Binda *et al.*, 2006).

Ambas isoformas parecen tener un importante papel en el control de la proliferación celular, ya que se ha visto que la inhiben, y producen un aumento de marcadores de senescencia celular, papel que ha sido asociado previamente a pRb (Binda *et al.*, 2006). Se ha encontrado una isoforma más corta de Rbp2 (de 100 KDa, en lugar de 200 KDa) que carece del dominio carboxilo-terminal, en

el cual se encuentra la región necesaria para el reclutamiento de enzimas deacetilasas (HDAC). Esta forma está presente en células de cáncer de mama que no expresan marcadores de senescencia celular. Así pues, se postula que esta forma corta de Rbp2 podría estar implicada en la inmortalidad de las células cancerígenas, bloqueando la senescencia celular (Cao *et al.*, 1999).

Rbp1/Arid4a y Rbp2/Arid4b se han encontrado en niveles elevados en varios tipos de cáncer: mama, pulmón, colon, páncreas y ovario (Cao *et al.*, 2001). Ambas isoformas han sido además caracterizadas como genes supresores de tumores, ya que se ha visto que ratones mutantes para *arid4a* y/o *arid4b* desarrollan leucemia mieloide aguda, asociada a una producción defectuosa de células sanguíneas. Estas células presentan cambios en el estado de metilación y acetilación de la cromatina, que promueven la malignidad tumoral (Wu *et al.*, 2008).

Así pues, las proteínas Rbp1/Arid4a y Rbp2/Arid4b, ortólogos de la proteína de *Drosophila* CG34422, poseen importantes funciones en el control de la proliferación celular, sirviendo de “puente” entre el complejo modificador de la cromatina Sin3A y las proteínas reguladoras del ciclo celular Rb y E2F.

7.4. El gen CG34422 como parte del complejo Sin3A/Rpd3 de *Drosophila*

Como hemos comentado previamente, el gen CG34422 ha sido incluido como parte del complejo Sin3A debido a sus características moleculares, que lo sitúan como ortólogo de los genes *rbp/arid* de humanos. Hasta la fecha, no existen trabajos que hayan comprobado si esta predicción molecular tiene relevancia funcional. Sin embargo, recientemente se ha encontrado en experimentos de inmunoprecipitación realizados en células de *Drosophila*, que CG34422 interacciona físicamente con Sin3A (Spain *et al.*, 2010), hecho que sugiere que podría tener una función como parte de este complejo en *Drosophila*.

El mantenimiento de las funciones del complejo Sin3A/HDAC en *Drosophila* es esencial para diversos procesos biológicos. Los complejos Sin3A son importantes para la viabilidad, como demuestra el hecho de que las mutaciones en el gen *sin3a* sean letales (Neufeld *et al.*, 1998b). Estudios en el ala de *Drosophila* han mostrado que Sin3A es necesario para la proliferación celular. De esta manera, se ha observado que la reducción de la función de *sin3a* da lugar a alas pequeñas y curvadas, fenotipo que se ha asociado a una disminución de la división celular en el ala (Swaminathan y Pile, 2010). Además, se ha comprobado que esta proteína es necesaria durante la transición G2/M del ciclo celular (Pile *et al.*, 2002). En esta línea, se ha demostrado que una disminución de la función de *sin3a* provoca la bajada de la transcripción de los genes reguladores del ciclo celular *string* y *cyc B*, y que un aumento en los niveles de *stg* es capaz de rescatar los defectos de crecimiento causados por la falta de *sin3a*. Además, recientemente se ha descrito que Sin3A es un regulador negativo de la progresión tumoral en *Drosophila*, ya que se ha observado que su ausencia promueve la aparición de crecimientos metastásicos y la transición epitelio-mesénquima en modelos de crecimiento tumoral (Das *et al.*, 2013).

En cuanto a la implicación de otros miembros del complejo en el control de la división, se ha descrito que tanto la eliminación de la deacetilasa Rpd3, como de los miembros del complejo Sap130, Sap18 y P55 provocan un retraso en la división celular, que sugiere que el ciclo celular podría verse alargado en el tiempo (Swaminathan y Pile, 2010; Swaminathan *et al.*, 2012). P55 además reprime a genes diana del factor de transcripción E2F (Taylor-Harding *et al.*, 2004). Otros miembros del complejo como Lid y Emsy son importantes para el control del balance entre proliferación y diferenciación. Por un lado, Lid promueve el crecimiento celular a través de su interacción con dMyc (Secombe *et al.*, 2007) y Emsy, en cambio, promueve la diferenciación y quiescencia celular (Sambasivan *et al.*, 2008).

En conjunto, las funciones descritas hasta el momento para el complejo Sin3A revelan que posee múltiples funciones durante el desarrollo. Este amplio efecto podría deberse a que sus funciones como modificador de la cromatina son susceptibles de afectar a una gran cantidad de potenciales dianas. Entender las posibles relaciones funcionales entre Emc y este complejo de proteínas es clave para poder definir una posible nueva función de los factores Id como reguladores del estado epigenético de la célula.

Objetivos

1. Estudiar la función de las proteínas de la familia bHLH Extramacrochaetae y Daughterless en el control de la proliferación celular durante el desarrollo del ala de *Drosophila melanogaster*
2. Definir el papel de estas dos proteínas como reguladores de la progresión del ciclo celular
3. Caracterizar genética y molecularmente nuevos mediadores de las funciones de Emc durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*

Materiales y Métodos

1. Cultivo de *Drosophila melanogaster*

El mantenimiento de todas las estirpes de *Drosophila* y la ejecución de los experimentos fueron llevados a cabo en cámaras de temperatura reguladas a 17°C, 25°C y 29°C, según el caso, en un medio de cultivo estándar preparado a partir de harina, glucosa, agar, levadura y ácido propiónico.

2. Estirpes de *Drosophila melanogaster* Gal4, UAS y construcciones reporteras

El sistema Gal4/UAS (Brand y Perrimon, 1993) permite dirigir la expresión de un gen en un dominio espacial determinado. El activador transcripcional de levaduras Gal4 se induce bajo el control de la región reguladora del gen que va a dirigir la expresión. Cuando este gen se activa, el Gal4 se une a sus secuencias diana UAS, activando la transcripción del gen que se encuentre a continuación en la secuencia (Figura M1). Para los análisis de sobre-expresión se emplearon las siguientes líneas Gal4: *nub-Gal4*, *en-Gal4*, *ap-Gal4* (Calleja *et al.*, 1996), *sal^{EPV}-Gal4* (Cruz *et al.*, 2009), *ptc-Gal4* y las líneas Janelia (GMR_Brain_exp_1 o Rubin Gal4 lines, Janelia Farm) *GMR_32F08*, *GMR_32C11*, *GMR_31B06* (Figura R14). Todas las líneas están descritas en FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>). Se utilizaron las líneas UAS: *UAS-mCD8-GFP*, *UAS-da* (I. Rodríguez), *UAS-sc* (S. Campuzano), *UAS-diap I*, *UAS-emc*, *UAS-N^{intra}* y *UAS-stg*. Las líneas *UAS-Id* (1-3) y *UAS-emc LK*, *TELE*, *DS* y *STOP* se generaron en el laboratorio de A. Baonza. También utilizamos líneas UAS para expresar ARN de interferencia: *UAS-emc^{ARNi}* (VDCR 100587), *UAS-da^{ARNi}* (VDCR 51300), *UAS-sin3a^{ARNi}* (VDCR 105852), *UAS-sap18^{ARNi}* (VDCR 15710), *UAS-p55^{ARNi}* (VDCR 26455), *UAS-brms1l-(CG4400)^{ARNi}* (VDCR 21618), *UAS-ing1-(CG7379)^{ARNi}* (VDCR 27998), *UAS-sds3-(CG14220)^{ARNi}* (VDCR 105162), *UAS-emsy-(CG15356)^{ARNi}* (VDCR 106820), *UAS-lid^{ARNi}* (VDCR 42203), *UAS-rpd3^{ARNi}* (VDCR 30600), *UAS-sap130^{ARNi}* (VDCR 31394), *UAS-CG34422-Nt^{ARNi}* (VDCR 40437), *UAS-CG34422-Ct^{ARNi}* (VDCR 27941).

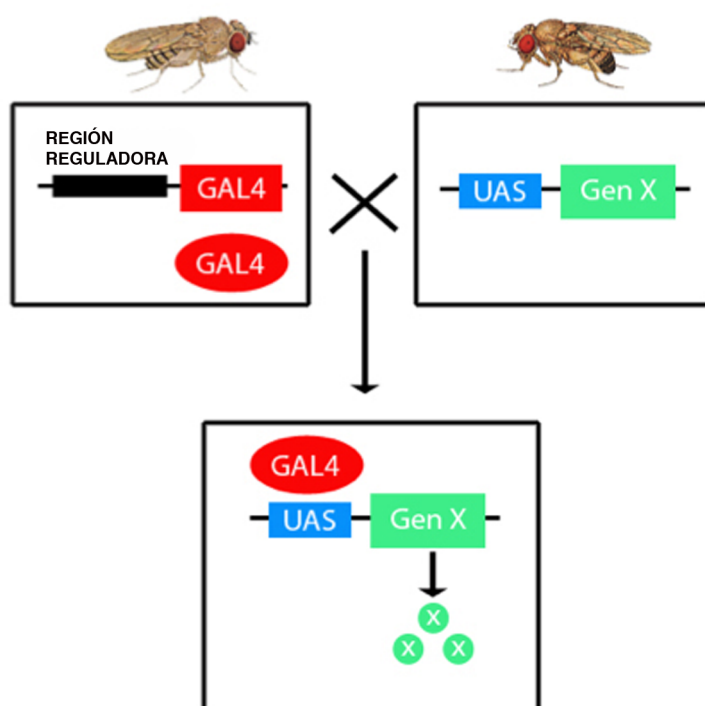


Figura M1: Sistema de expresión génica Gal4/UAS. Cuando un individuo portador del transgén *UAS-GenX* se cruza con otro portador del transgén *Gal4*, se genera una progenie portadora de ambos transgenes. La proteína Gal4 se une a la región UAS, y activa la transcripción del gen X siguiendo el patrón determinado por la región reguladora, que dirige la expresión del Gal4 (Modificado de la Tesis de J. Menéndez).

La línea reportera *stg-107-112-LacZ* fue generada en el laboratorio de F. Casares, y reproduce el patrón de expresión del fragmento Crom 3R: 25,107,755 - 25,112,777 de la región reguladora de *stg* (Figura R14). Las líneas reporteras LacZ *pstg-β*, *pstg-β-E3.2* y *pstg-β-E2.2* (Figura R14) provienen del laboratorio de B. Edgar. La línea reportera *sal^{EPV}-eGFP* fue generada en el laboratorio de J.F. de Célis. También se utilizó la línea reportera *PCNA-GFP*.

3. Sistema Gal4/ Gal80^{ts}

Esta técnica es una variación del sistema Gal4, en el que se utiliza el factor Gal80^{ts} para controlar temporalmente la activación de los genes regulados por la secuencia UAS. La proteína Gal80 es un inhibidor del factor de transcripción Gal4, que cuando es expresado se une a la proteína Gal4 e inhibe su función transcripcional. La actividad de Gal80^{ts} es sensible a la temperatura por lo que a 29° C no es funcional (Figura M2). Por lo tanto, para activar temporalmente y apagar la expresión de la línea *UAS-da* mantuvimos las moscas *en o ap-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da; tub-Gal80ts/+* a 18°C hasta el inicio del tercer estadio larvario, tras el cual las larvas se traspasaron a 29° C durante 48 horas. El factor transcripcional Gal80^{ts}, se encuentra bajo la regulación del promotor del gen *tubulina*, con el fin de que sea expresado en todas las células de la larva.

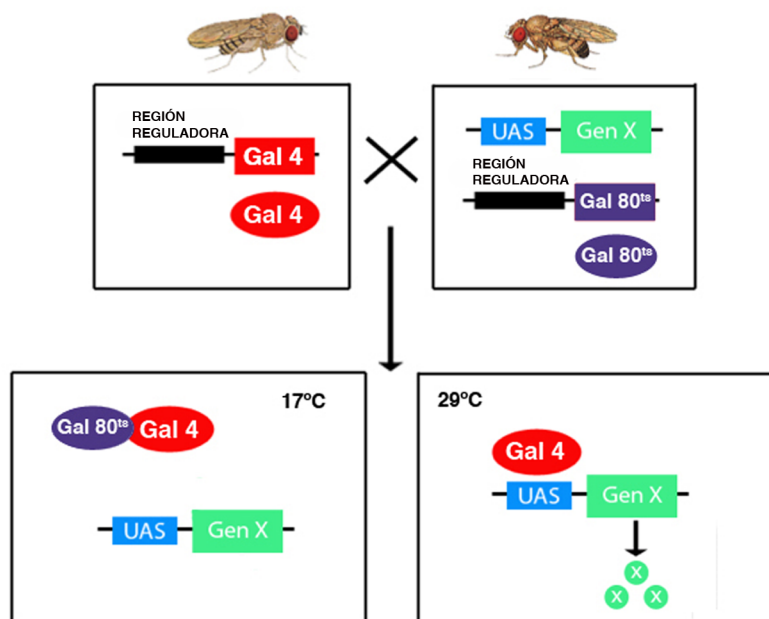


Figura M2: Sistema de expresión génica Gal4/UAS; Gal80^{ts}. Cuando un individuo portador de los transgenes *UAS-GenX tubulina-Gal80^{ts}* se cruza con otro individuo portador del transgén *Gal4*, parte de la progenie será portadora de los 3 transgenes. La presencia de la proteína Gal80^{ts} reprimirá la función del Gal4 a 17° C. Por el contrario, a 29° C, la proteína Gal80^{ts} se inactiva, permitiendo que el factor Gal4 active la expresión de los genes que se encuentran bajo la regulación de la región UAS (Modificado de la Tesis de J. Menéndez).

4. Análisis clonal

Para analizar los fenotipos de falta de función de *emc* se cruzaron las líneas *emc¹FRT2A/TM6B* con *ywhsf1p/FM7; tub-Gal4-UAS-GFP/Cyo; tub-Gal80-FRT2A/TM6B*. Los clones control se realizaron utilizando el cromosoma *FRT2A*. Se distinguieron clones por la presencia de GFP (Figura R1).

Los clones *emc^{AP6}* se generaron cruzando las líneas *ywhsflp; emc^{AP6} FRT80/TM6B* con *ywhsflp; Ubi-GFP-FRT80/TM6B*. Los clones que combinaban la falta de *emc* y *da* se realizaron cruzando las líneas *ywhsflp; da³ ck FRT40; p(da⁺)Ubi-GFP-FRT80/SM6a-TM6b* con *w; da³ ck FRT40; emc^{AP6} FRT80/S-T*. Los clones control se realizaron utilizando el cromosoma *FRT40*. Se distinguió la presencia de clones por la ausencia de GFP, los clones hermanos aparecen marcados con doble dosis de GFP (Figura R1).

Para analizar los efectos de la muerte celular en los fenotipos de falta de *emc*, se cruzaron las líneas *emc¹ mwh Df(3L)H99* y *emc¹ mwh* con *M(3)ⁱ⁵⁵*. La progenie de estos cruces se irradió con rayos X a las 48-72h TPH para producir la recombinación mitótica, mediante el uso de una fuente MG X-ray Philips 100 KV, 15 mA, 2 mm, a una dosis de 1000rad. Las células homocigóticas mutantes se identificaron por la presencia del marcador celular *mwh* (*multiple wing hair*) (Figura R3).

Los clones de falta de función de *da* analizados durante el estadio pupal (Figura R9) se realizaron con el alelo *da¹⁰*. Para ello, se cruzó la línea *da¹⁰ FRT40/CyO* con *ywhsflp/FM7; tub-Gal4-UAS-GFP/CyO; tub-Gal80-FRT40/S-T*. Los clones se distinguen por la presencia de GFP. Las pupas se dataron cogiendo larvas de tercer estadio y contando el tiempo tras la formación de la pre-pupa (pupa blanca).

Los clones de sobre-expresión *UAS-da* se obtuvieron siguiendo dos metodologías:

En la primera, se utilizaron hembras de genotipo *hsflp; act5C<FRTyellow⁺ FRT>Gal4 UAS-GFP/CyO* que se cruzaron con machos *UAS-da*. En estas moscas, el choque térmico produce la recombinación permitiendo la expresión del *Gal4* bajo el control del promotor de *actina*. Los clones se distinguieron por la presencia de GFP (Figura R10). En la segunda, se utilizó el sistema *Gal4/Gal80*, cruzando moscas de genotipo *UAS-da; FRT82* con moscas *ywhsflp; tub-Gal4-UAS-GFP; tub-Gal80-FRT82/S-T*. Los clones se distinguieron por la presencia de GFP (Figura R19).

Para analizar el efecto de la eliminación del complejo E(spl) en los fenotipos producidos por la sobre-expresión de *Da*, se cruzaron machos *UAS-da; E(spl)^{b32.2} FRT82* con hembras *ywhsflp tub-Gal4-UAS-GFP; tub-Gal80-FRT82/S-T*. Los clones se distinguieron por la presencia de GFP (Figura R19).

Los clones de sobre-expresión de Notch se realizaron cruzando la línea *UAS-N^{intra} FRT82/S-T* con la línea *ywhsflp tub-Gal4-UAS-GFP; tub-Gal80-FRT82/S-T*. Los clones de falta de función de *emc* y sobre-expresión de Notch se realizaron cruzando la línea *UAS-N^{intra}; emc¹ FRT2A/S-T* con *ywhsflp/FM7; tub-Gal4-UAS-GFP/CyO; tub-Gal80-FRT2A/TM6B*.

Para generar clones de falta de función o los realizados mediante el sistema *Gal4/Gal80* (sistema MARCM, Lee y Luo, 1999), se sometió a las larvas a un choque de calor a 37°C durante 1 hora a lo largo del segundo estadio larvario (60 ± 12 h horas tras la puesta del embrión). Los clones de sobre-expresión de *da* realizados con la construcción *Act5C<FRTy+FRT>Gal4* se indujeron a las 60 ± 12 h mediante un choque de calor a 37°C durante 12 minutos. Los discos imaginales se diseccionaron a los 3 días tras el choque térmico, y se tiñeron y montaron como se describe en el

apartado de inmunohistoquímica. El tamaño de los clones se cuantificó contando el número de células GFP +, teñidas con el marcador de ADN nuclear TOPRO.

4.1. Cálculo del tiempo de duplicación celular

El cálculo del tiempo de duplicación celular se realizó siguiendo el método descrito por Neufeld *et al.*, (1998). Para ello, los experimentos para obtener los clones control y mutantes se realizaron siempre en paralelo. Se aplicó la fórmula $(\log N / \log_2)h$, donde N es el número de células del clon (marcadas por la presencia de GFP), y h son las horas que han pasado entre el choque térmico y la fijación.

5. Tinciones inmunohistoquímicas

Para las tinciones inmunohistoquímicas se fijaron cabezas de larva de tercer estadio durante 22 minutos en Paraformaldehído 4% (PFA). Posteriormente se realizaron 3 lavados de 15 minutos con PBS-Tritón X-100 0,3% (PBT) y otros 3 lavados de 15 minutos con PBT con BSA 1% y NaCl 250 mM. Después se incubaron con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Tras retirar el anticuerpo primario y realizar varios lavados con PBT, se incubaron las cabezas con anticuerpo secundario diluido en PBT con BSA 1% y NaCl 250 mM, durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se lavaron las larvas diseccionadas con PBT y se montaron las partes a analizar sobre portaobjetos en medio Vectashield (Vector Laboratories).

Los anticuerpos primarios utilizados y sus correspondientes diluciones fueron las siguientes: conejo anti-Caspasa3 activada (1:50; Cas3, Cell Signalling Technology), conejo anti-Histona3 Fosforilada (1:500; PH3, Cell Signalling Technology), ratón anti-β-Galactosidasa (1:1000; Promega), conejo anti-Emc (1:50; de Jan y Jan (1994)), conejo anti-Da (de Cummings y Cronmiller (1994)), ratón anti-Flag (1:100; Sigma), ratón anti-GFP (1:100), (Roche). Parte de los anticuerpos primarios utilizados provienen del *Hybridoma Bank* de la Universidad de Iowa, y fueron: ratón anti-Wg (1:50) y anti-CycB (1:10). Los anticuerpos secundarios unidos a fluoróforo fueron Alexa Fluor 488, 555 y 647, de Molecular Probes™. En algunos casos, simultáneamente a la incubación con los anticuerpos secundarios, se incubó con Faloidina conjugada con TRITC (tetrametilrodamina B isotiocianato, Sigma, 1:200) para visualizar la Actina cortical.

6. Hibridación *in situ*

Las hibridaciones *in situ* realizadas en los discos imaginales se llevaron a cabo con una sonda de ARN que reconoce el ARNm de *string*, marcada con Digoxigenina. La producción de esta sonda fue llevada a cabo por Baonza *et al.* (2002). Para la hibridación *in situ*, se fijaron cabezas de larva de tercer estadio durante 30 minutos en PFA 4% en PBS. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBS 0,1%

Tween20 (PBS-T), se fijaron de nuevo durante 20 minutos con PFA 4% en PBS-T, se realizaron varios lavados con PBS-T y se guardaron a -20°C en Solución de Hibridación (50% Formamida, SSC 5X, 100 $\mu\text{l}/\text{mg}$ ADN de esperma de salmón, 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ heparina y 0,1 % Tween-20). Tras 2 horas de pre-hibridación a 55°C en Solución de Hibridación se llevó a cabo la hibridación a 55°C con 2 μl de sonda (desnaturalizada a 80°C durante 10 minutos) en 100 μl de Solución de Hibridación, durante toda la noche. El exceso de sonda se lavó a 55°C con Solución de Hibridación y con solución HYBE (50% Formamida y SSC5X) + PBS-T. Para la detección de la sonda se realizó una incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-Digoxigenina (Roche™) en una dilución 1:4000. Para el revelado se empleó Solución de Color (100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2 , 100 mM Tris-HCl pH 9,5 y 0,1% Tween20) a la que se añadió NBT (0,45% v:v) y BCIP (0,35% v:v) (Roche™). El tiempo de revelado fue de entre 20-40 minutos, tras lo cual se realizaron varios lavados con PBS-T. Los discos se montaron en glicerol 70%. En todos los pasos anteriores a la hibridación con la sonda, las soluciones acuosas se trataron previamente con DEPC, para eliminar las nucleasas y se autoclavaron.

7. Métodos de microscopía y procesamiento de imágenes

7.1. Microscopía óptica

Las imágenes se tomaron con una cámara Spot digital acoplada a un microscopio Zeiss Axioplan™ o con una cámara digital Leica DFC300Fx acoplada a una lupa binocular Leica MZFLIII.

7.2. Microscopía confocal

Se utilizaron los equipos del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Las imágenes de microscopía confocal fueron capturadas en un microscopio confocal vertical LSM 510 (Zeiss).

7.3. Procesado de imágenes

El posterior procesamiento de las imágenes se realizó con los programas ImageJA 1.45b y Adobe Photoshop™ CS4.

8. Cálculo del índice mitótico y cuantificación de fluorescencia en discos imaginales

Cuantificamos utilizando Adobe-Photoshop™ CS4 el número de células en mitosis, detectadas por la expresión de Fosfo-Histona 3 (PH3) y el área de la región de expresión correspondiente en cada caso, en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario. El índice mitótico se calculó como la media del número de células en mitosis entre el área de la región en estudio. Las imágenes utilizadas para realizar este análisis fueron proyecciones de 20 planos focales de un mismo disco. Se utilizaron al menos 10 discos por genotipo estudiado.

Para cuantificar la fluorescencia emitida por los reporteros GFP, se tomaron imágenes de microscopía confocal de los discos imaginales de ala, tomando varios planos de un micrómetro, de modo que cubrieran el grosor del disco. En primer lugar, se tomaron las imágenes del genotipo con mayor fluorescencia aparente, para el que se definieron los parámetros de saturación de fluorescencia adecuados. A continuación, se tomaron las imágenes del genotipo a comparar, manteniendo los parámetros fijados para el primero. Para cuantificar la fluorescencia, se utilizó el programa ImageJA 1.45b, definiendo el territorio presuntivo de ala, y utilizando el valor “*mean grey*” (media de grises) para definir la intensidad de GFP. Se cuantificaron al menos 9 discos de ala por genotipo, y se compararon utilizando el test T de Student. Se consideró significativo un p -valor $< 0,05$.

9. Preparación de alas adultas y cuantificación del tamaño del ala

Las preparaciones de alas adultas se realizaron en un medio de montaje compuesto por ácido láctico/etanol (6:5). Para calcular el tamaño de las alas adultas se fotografiaron al menos 10 alas de hembras o machos correspondientes a los diferentes genotipos a cuantificar, empleando el objetivo 5X, y se midió su área en píxeles con el programa Adobe-Photoshop™ CS4. El número y el tamaño celular se estimaron a partir de la cuantificación del número de células en una región del compartimento posterior del ala en fotos realizadas con el objetivo 20X, usando el mismo programa informático.

10. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo mediante la técnica de FACS (“*Fluorescence Activated Cell Sorting*”). Para ello se diseccionaron 25-30 larvas de tercer estadio larvario en PBS a 4°C y se recogieron los discos imaginales de ala en un tubo eppendorf con PBS a 4°C. Los discos se acumularon en el fondo del eppendorf por centrifugación y se eliminó el PBS. Posteriormente se añadieron 300 µl de tripsina (Trypsin-EDTA Sigma T4299) + 1 µl de Hoescht (Hoescht 33342, Trihydrochloride Trihydrate H3570, Molecular Probes™) y se incubó a 28°C en agitación suave durante 40 minutos. Durante la incubación, cada 10 minutos se pipetearon suavemente los discos para ayudar a disgregar las células. Para parar la reacción de tripsina sobre los discos se añadieron 200 µl de PBS + FBS (*Fetal Bovine Serum*, Sigma™ 9665) 1% a 4°C, y la mezcla se agitó suavemente, se centrifugó a 1500 g a 4°C durante 5 minutos y se resuspendió en 300 µl de PBS + FBS 1% a 4°C. El análisis de las muestras fue llevado a cabo en un equipo FACS Vantage 2 (Becton Dickinson™), por el personal del servicio de Citometría de Flujo del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Se realizaron 3-4 experimentos independientes por genotipo, obteniendo los perfiles de ciclo celular en cada experimento con poblaciones de más de 10.000 células. La temperatura de ejecución de todos los cruces fue de 25°C, y se diseccionaron las larvas a los 7 días tras la puesta. Los perfiles de ciclo celular y los análisis de las poblaciones celulares se realizaron con el programa informático

FloJow 7.5. Se cuantificó la proporción de células en cada fase del ciclo en la región de expresión escogida en cada caso y en el resto del disco para cada genotipo. Los genotipos analizados fueron:

- *ap-Gal4 UAS-GFP/+*
- *ap-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-emc^{ARNi}/+*
- *nub-Gal4 UAS-GFP/+*
- *nub-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-emc^{ARNi}/+*
- *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/+*
- *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/UAS-da*
- *en-Gal4 UAS-GFP/+; tub-Gal80^{ts}/+*
- *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-da; tub-Gal80^{ts}/+*

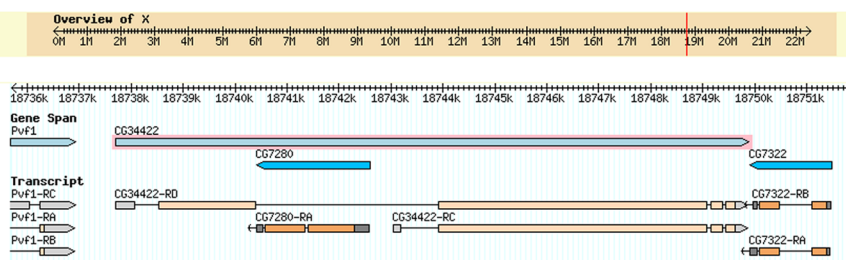
11. Producción del anticuerpo anti-CG34422

Para producir el anticuerpo, se diseñó en primer lugar una proteína recombinante con un fragmento de CG34422 fusionado a la proteína GST. Se seleccionó un fragmento de 885 pb situado entre las dianas de restricción BamHI y EcoRI (Figura M3 B, sombreado en rojo). El fragmento se tomó del clon de ADN LD25641 (Flybase). Para ello, se empleó 1 µg de ADN, que se digirió con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (NE Biolabs) durante 2h a 37° C, y se corrió en un gel de agarosa 1% (con BrEt 0,2 µg/ml) en tampón TAE. El fragmento de 885 pb se recortó del gel y se extrajo del mismo mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). El fragmento fue clonado en el vector pGEX2T que permite crear proteínas de fusión a GST. La proteína GST queda en posición N-terminal a la proteína de interés. El vector se digirió del mismo modo que el inserto, salvo porque en la última hora de digestión se añadió 1 µl de enzima Fosfatasa Alcalina (Roche™) para desfosforilar el extremo 5' y evitar la formación de concatémeros. La digestión se purificó con el kit MinElute PCR purification Kit (Qiagen). La concentración de vector e inserto se estimó en un gel de agarosa al 1% con 1 µl de vector y de inserto, junto con 1 µl del marcador de tamaño Hyper Ladder 1 (Bioline). La reacción de ligación se llevó a cabo siguiendo la fórmula:

$$\text{ng de inserto} = (100 \text{ ng vector} \times \text{tamaño inserto (pb)} / \text{tamaño vector (pb)}) \times 3$$

Una vez calculados los volúmenes de inserto y vector a añadir, se pusieron en una reacción de ligación de 10 µl de volumen final, empleando la enzima Ligasa T4 (Promega), y se mantuvo toda la noche a 16° C. A continuación, se transformaron bacterias competentes (One Shot Top10 Chemically Competent E. Coli, Invitrogen) mediante un choque térmico de 30 seg a 42° C (siguiendo el protocolo del proveedor), que se sembraron en placas de LB-agar con Ampicilina (100 mg/ml), y se incubaron toda la noche a 37° C. Para chequear los clones positivos, se seleccionaron 10 colonias, que se cultivaron toda la noche en LB con Ampicilina (100 mg/ml) en agitación a 37° C. Se extrajo el

A



B

Región genómica de CG34422



Figura M3: Mapa de la región genómica de CG34422. (A) Imagen obtenida de Flybase en la que se muestra la región genómica que contiene al gen CG34422, que codifica para dos transcritos: CG34422-RD y CG34422-RC. En la hebra complementaria, se encuentra la secuencia codificante de otro gen, CG7280. (B) Secuencia de la región genómica completa de CG34422. En gris claro se han señalado las regiones intrónicas. La construcción CG34422-Nt contiene la región marcada en azul, que es la región codificante desde el primer ATG hasta el primer codón de STOP (excluido). Los dos primeros codones (ATG CAG) se incluyeron en el oligonucleótido usado para clonar la región y se pegaron al resto de la secuencia señalada en azul, para evitar la región intrónica que hay entre ambos. En rojo, se ha resaltado el fragmento que se empleó en la construcción CG34422-GST, utilizada para generar un anticuerpo. En verde, se ha señalado la secuencia que incluye el transgén UAS-CG34422-Ct hasta el último codón de STOP (excluido).

ADN plasmídico mediante el método de miniprep utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Con 1 µg del ADN obtenido, se realizaron digestiones dobles con BamHI y EcoRI, y se seleccionaron aquellas digestiones que produjeron fragmentos de los tamaños esperados, que se secuenciaron en el servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid.

Una vez se comprobó que el fragmento se había clonado de forma correcta, se transformaron 10 ng del ADN recombinante en células electro-competentes de la estirpe BL-21 (generadas en el servicio de fermentación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa) que se sembraron en placas de LB-agar con Ampicilina. Se escogió una de las colonias para inducir la expresión de la proteína de fusión CG34422-GST. Ésta se cultivó en un matraz con 50 ml de LB con Ampicilina 0,05% durante toda la noche en agitación a 37° C. A continuación, se añadieron 450 ml de LB con Ampicilina, se trasladó la muestra a un matraz de 2 l de capacidad y se mantuvo en agitación a 37° C, hasta que el cultivo presentó una densidad óptica de 0,6, medida a una longitud de onda de 600 nm. Se añadió IPTG (c.f. 1 mM) y se mantuvo 4 h a 30° C en agitación. Se tomaron muestras del cultivo de 100 µl y 900 µl a tiempo 0 (antes de la inducción), 2 h y 4 h, para comprobar si se inducía la proteína de fusión, y si ésta era soluble. Las alícuotas se centrifugaron 5 min a 2000 g, se eliminó el sobrenadante, y se congelaron a -20° C hasta su utilización. Pasadas las 4h, se centrifugó el cultivo 15 min a 2000 g. Luego se lavaron las bacterias con PBS y se volvieron a centrifugar del mismo modo. El precipitado bacteriano se congeló a -80° C hasta su utilización.

Los precipitados de 100 µl se calentaron a 95° C 5 min con tampón de carga estándar para proteínas (Tris-HCl 1 M pH 6,8, Glicerol 87%, SDS 10%, β-Mercaptoetanol 10% y azul de Bromofenol 10%), y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS), junto con el marcador de peso molecular ProSieve Color Protein Marker (Lonza). El gel se tiñó por inmersión en Azul de Coomassie 0,25% (Coomassie Brilliant Blue R250) durante 30 min en agitación, y se destiñó con solución de desteñido (Metanol 40%, Ácido Acético 10%) durante toda la noche en agitación. Se observó la expresión de la proteína de fusión desde las 2 h tras la inducción. Con las alícuotas de 900 µl comprobó que la proteína se expresaba en la fracción soluble (este protocolo se repitió después con el cultivo de 500 ml). Se resuspendieron las bacterias en Tampón de Lisis (Tritón X100 10% en PBS, con inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche)), en 50 µl si se trató de las alícuotas de 900 µl, y en 50 ml si se trató del cultivo total de 500 ml. Se añadió Lisozima (c.f. 1 mg/ml) y se mantuvo en hielo 10 min. Después se añadió DNasa I (c.f. 0,02 mg/ml) y MgCl₂ (c.f. 3mM) y se mantuvo en hielo 10 min. A continuación, se sonicó la muestra en un sonicador de baño con hielo durante 10 min en el caso de las muestras pequeñas de 900 µl, y en un sonicador de vástago (3 pulsos de 10 seg) para el cultivo total. Después, se congeló la muestra en N₂ líquido y se descongeló en un baño a 37° C tres veces. Por último, se centrifugó la muestra a 8.000 g durante 25 min a 4° C. Se separó el sobrenadante del precipitado y se congelaron por separado a -80° C. Se corrió un gel de poliacrilamida al 10% con una fracción del sobrenadante y otra del precipitado, para comprobar la solubilidad de la proteína. La proteína de fusión CG34422-GST se encontró en la fracción soluble.

Para purificar la proteína de fusión CG34422-GST, se empleó una columna de Glutathione Sepharosa 4B (GE Healthcare), que se lavó con PBS + EDTA 10 mM y Tampón de Lisis (10 volúmenes más que lo que se añadiera de Sepharosa, que en este caso fueron 4 ml). Se incubó la proteína con la Sepharosa durante 2 h a 4° C en una noria. A partir de este momento, el protocolo se realizó en una cámara fría a 4° C, para evitar la degradación proteica. Se descartó la fracción no retenida a la columna, y se lavó la columna dos veces con Tampón de Lisis. La elución de la proteína de fusión se

realizó con Glutathione 10 mM en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, con inhibidores de proteasas, en un volumen total de 20 ml. Se recogieron 7 fracciones de 3 ml cada una y se cargó una muestra en un gel de poliacrilamida al 10% para comprobar la presencia de la proteína de fusión. El resultado se observa en la Figura M4 A. Se juntaron las fracciones 2-7, concentrando la muestra por ultrafiltración con los dispositivos Amicon Ultra 10K (Millipore), y se valoró la concentración de proteína obtenida mediante el kit Bio Rad DC Protein Assay. La proteína purificada se inyectó en dos cobayas para la producción del antisuero, en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Se inocularon los animales 4 veces durante 2 meses (una inyección cada 15 días), con 400 µg de proteína purificada cada vez. La primera y cuarta inyección fueron intradérmicas, y la segunda y tercera intramusculares. Para la preparación de la emulsión a inyectar, se mezclaron volúmenes iguales (600 µl de cada uno) de proteína y coadyuvante (completo para la primera inyección, incompleto para las 3 restantes, Freund's Adjuvant, Sigma). La mezcla se agitó con un vortex, y se sonicó en un baño a temperatura ambiente 10 min. El procesamiento del suero se realizó sometiendo la sangre de cada animal a una temperatura de 37° C durante 30 min. Después se mantuvo a 4° C toda la noche, y se centrifugó 20 min a 800 g. El sobrenadante es el antisuero que contiene nuestros anticuerpos, entre todas las proteínas del plasma sanguíneo.

Se purificaron las IgG totales presentes en 2 ml de antisuero. Se fabricó una columna empleando 1 ml de resina compuesta de Proteína A-Sepharosa (GE Healthcare). La columna se equilibró con 20 ml de Tampón de Unión (NaCl 3 M, Glicina 1,5 M, pH 8,9). Por cada ml de suero que se purificó, se añadió 1 ml de Tampón de Unión y 175,32 mg de NaCl (3 M c.f.). Una vez se ha disuelto el NaCl, se añadió la muestra a la columna (a 4° C) y se lavó con 10 ml de Tampón de Unión. A continuación, se eluyeron las IgG, empleando 1 ml de 3 tampones distintos: 1) Ácido Cítrico 100 mM pH 6, 2) Ácido Cítrico 100 mM pH 5, 3) Ácido Cítrico 100 mM pH 4. Los eluidos se recogieron en tubos que contenían previamente 5 gotas de Tris-HCl 2 M pH8, para neutralizar el pH del Ácido Cítrico. Se recogieron eluidos de 20 gotas (2 eluidos por tampón). El resultado se comprobó realizando inmunotinciones sobre cabezas de larva. Se escogieron los dos eluidos obtenidos con el tampón 2, en base a los resultados obtenidos en las inmunotinciones.

12. Experimentos de inmunoprecipitación (*pull down*)

Para evaluar la unión directa de Emc a otras proteínas, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación, para los cuales se generó una proteína de fusión Emc-GST, que se solubilizó en tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 0,5% con inhibidores de proteasas) junto con la proteína a testar, marcada radiactivamente. En paralelo, como control negativo, se utilizó la proteína GST, que no debe unirse a la proteína radiactiva.

Para la síntesis de la proteína de fusión Emc-GST, se amplificó por PCR la secuencia completa de *emc* con la enzima KOD (Novagen), utilizando como molde el clon LD10532 (Flybase). Se añadieron las dianas de restricción BamHI y EcoRI en 5' y 3' de la secuencia, para poder clonar el fragmento de PCR en el vector pGEX4T1, de la misma manera que se indicó en el apartado 11.

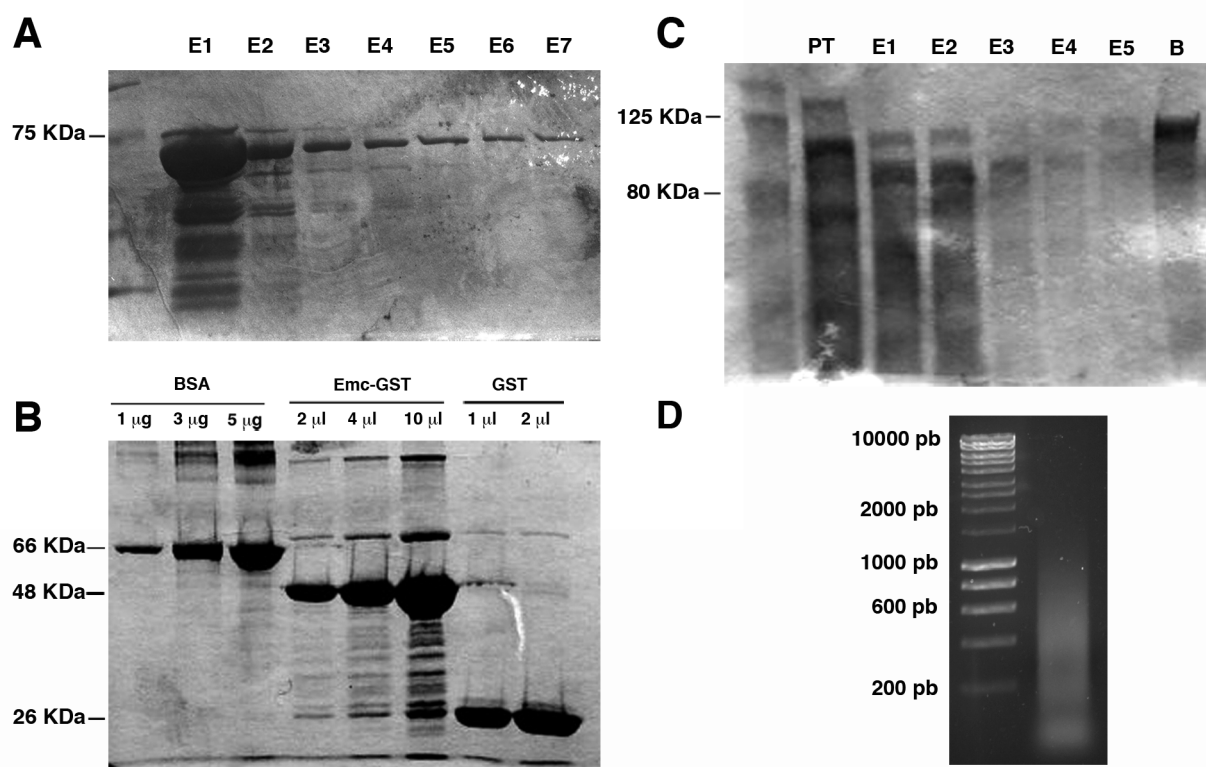


Figura M4: Construcción de proteínas de fusión y fragmentación de cromatina. (A) Resultado de la elución de la proteína de fusión CG34422-GST (75 KDa) en un gel teñido con azul de Coomasie. Las calles E1-E7 contienen los 7 eluidos que se recogieron durante la purificación. La primera calle contiene el marcador de Peso Molecular. **(B)** Estimación de las cantidades relativas de las proteínas BSA (66 KDa), Emc-GST (48KDa) y GST (26 KDa), en un gel teñido con azul de Coomasie. En cada carril se ha especificado la cantidad que se cargó en el gel en cada caso. **(C)** Resultado de la elución de la proteína de fusión Da-GST (90 KDa) tras la tinción del gel con azul de Coomasie. La primera calle contiene el marcador de Peso Molecular, la segunda (PT, “*Past Through*”) contiene una muestra de la fracción no retenida en la columna. Las calles E1-E5 contienen los 5 eluidos recogidos durante la purificación, donde la proteína de fusión Da-GST aparece representada por dos bandas. La última calle (B) corresponde a una fracción de la columna de Sepharosa empleada en la purificación, en la que se aprecia proteína Da-GST no eluída. **(D)** Experimento representativo del “control de calidad” de fragmentación de la cromatina. La primera calle corresponde al marcador de tamaño.

Se indujo la expresión de la proteína de fusión Emc-GST en paralelo a la GST sola, del modo indicado en el apartado 11. Ambas proteínas se indujeron tempranamente a las 2 h tras la adición del IPTG, y fueron solubles. Se purificaron en columnas de 2 ml de Glutathione Sepharosa 4B como se ha indicado previamente, con la salvedad de que no se realizó el paso final de elución de la proteína, ya que se quería conservar las proteínas unidas a la Sepharosa. Así pues, se extrajo el contenido de la columna, que se conservó en alícuotas de 90 µl de proteína con 10 µl de glicerol 80%, a -80° C. Para evaluar cantidad de proteína presente en las alícuotas, y poder establecer una proporción entre la cantidad de Emc-GST y GST que se debía añadir en los ensayos de inmunoprecipitación, se corrió un gel de poliacrilamida al 10%, junto con 3 concentraciones conocidas de BSA. El resultado se muestra en la Figura M4. Se estableció que la proporción equivalente de Emc-GST/GST era de 5 a 1. Así, en cada ensayo de inmunoprecipitación se utilizaron 20 µl de Emc-GST por cada 4 µl de GST.

Para generar las proteínas marcadas radiactivamente, se utilizó el kit TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega), mediante el cual se transcribe y traduce la proteína

a partir de su secuencia de ADN clonada en un vector con un promotor T7, gracias a un sistema celular de reticulocitos. Para marcar radiativamente las proteínas, se añadió a la reacción el aminoácido Metionina marcado con S^{35} (Met- S^{35}). La mezcla de aminoácidos de la que disponen las células carece de Metionina, de modo que la proteína de nueva síntesis incorporará el aminoácido radiactivo. Para cada reacción, se emplearon 40 μ l del lisado de reticulocitos (Quick Master Mix), 1 μ g de ADN plasmídico y 1 μ l de Met- S^{35} , en un volumen final de 50 μ l. La reacción se llevó a cabo a 30° C durante 90 min. Se emplearon los clones LD29371 (*da-pOT2*), LD30448 (*CG10576-pOT2*) y LD25641 (*CG34422-pOT2*) como molde para la producción de las proteínas Daughterless, CG10576 y CG34422.

Para el ensayo de inmunoprecipitación, se incubaron en 200 μ l de Tampón A: 5 μ l de proteína-Met- S^{35} + 20 μ l de Emc-GST o 4 μ l de GST, durante 2h, en una noria a 4° C. A continuación, se centrifugaron las muestras 2 min a máxima velocidad. La Sepharosa arrastra a los complejos Emc-GST-proteína-Met- S^{35} o GST-proteína-Met- S^{35} al fondo del tubo. Después se lavó 5 veces cada muestra con 1 ml de Tampón A (frío) y tras cada lavado se centrifugó 2 min a máxima velocidad. En el caso de la proteína Daughterless, se empleó un tampón con mayor fuerza iónica (Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 100 mM, KCl 300mM, Tritón X-100 0,1% con inhibidores de proteasas), que ayudó a eliminar uniones inespecíficas.

Los precipitados de las muestras incubadas con Emc-GST y con GST se resuspendieron en tampón de carga tras el último lavado y se corrieron en geles de poliacrilamida, del 10% para Da y CG10575 (que tienen un peso molecular aproximado de 90 KDa y 50 KDa, respectivamente), y del 6% para CG34422 (que tiene un peso molecular de 190 KDa). Además, se cargó 1 μ l de cada síntesis de proteína radiactiva como control. Todas las muestras se incubaron 5 min a 95° C con tampón de carga antes de cargarse en el gel para la desnaturalización de las proteínas. Tras el fin de la electroforesis, los geles se fijaron durante 15 min en una solución con metanol 40% y ácido acético al 10%, y después se incubaron en solución Amplify (GE Healthcare) durante 15 min en oscuridad para amplificar la señal radiactiva. Los geles se secaron en un secageles al vacío y se revelaron tras su exposición a una película autorradiográfica en oscuridad a -80° C durante tiempo variable (desde toda la noche, a 3 días) (Figura R23).

13. Ensayo de Retardo en Gel

Este ensayo, también llamado EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), se utiliza para evaluar la capacidad de unión al ADN de determinadas proteínas, principalmente factores de transcripción. En esta Tesis, se utilizó para saber si la proteína Daughterless se unía a un fragmento de la región promotora del gen *string*.

Se generó una proteína de fusión Da-GST para lo que se empleó el sistema Gateway (Invitrogen), que se basa en la clonación de la secuencia de ADN deseada en un vector aceptor pENTR/D-TOPO, que posee una secuencia para llevar a cabo una reacción de recombinación homóloga con otro vector (vector destino), al cual se transfiere la secuencia en estudio. Los vectores

destino son variados, en este caso se empleó el vector pDEST 15, que posee la secuencia de GST en posición 5' al sitio de recombinación. Se amplificó por PCR la secuencia codificante completa del gen *daughterless* con la enzima polimerasa KOD, usando como molde el clon LD29375. Se utilizaron los oligonucleótidos 5' CACCATGGGCGACCACTGACGATG 3' y 5' CTATTGCGGAAGCTGGGCGTG 3'. El producto de PCR se purificó con el kit MinElute PCR purification Kit (Qiagen), y se clonó en el vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen) de modo direccional, gracias a la inclusión de la secuencia CACC en el oligonucleótido 5' que es complementaria a un extremo protuberante del vector pENTR/D-TOPO. Para el clonaje, se añadió 1 µl de producto de PCR purificado, 0,5 µl de Salt Solution, 0,5 µl de vector pENTR/D-TOPO y 1 µl de H₂O (Vf = 3 µl). La mezcla se incubó 20 min a temperatura ambiente, tras lo cual se transformó todo el volumen en bacterias competentes (One Shot Top10 Chemically Competent E. Coli, Invitrogen). Los clones positivos crecidos en placas de LB con Kanamicina (50 µg/ml) se chequearon por PCR con los oligonucleótidos antes descritos. A continuación, se llevó a cabo la reacción de recombinación LR, que contenía 75 ng del vector *da-pENTR/D-TOPO*, 75 ng del vector pDEST 15 y H₂O hasta 4 µl. Se añadió a la mezcla 1 µl de LR Clonase II (Invitrogen) y se mantuvo 2 h a 25° C. Después se añadió 1 µl de Proteinasa K (Invitrogen), y se mantuvo 15 min a 37° C. Se transformaron 5 µl en bacterias competentes, como se ha descrito previamente, y se sembraron en placas de LB-Ampicilina. Los clones positivos, chequeados por PCR, se secuenciaron previamente a la inducción de la expresión de la proteína.

Se indujo la expresión de la proteína según el protocolo descrito en el apartado 11, con IPTG 1 mM durante 3 h a 30° C. Se realizó la extracción de las proteínas solubles, si bien en esta ocasión se empleó un Tampón de Lisis sin detergentes, ya que se observó que la proteína no se unía a la columna en presencia de los mismos. El Tampón de Lisis contenía: PBS 1X, EDTA 10 mM y Lisozima 0,2 mg/ml, se añadieron 50 ml de este tampón a las bacterias y se incubó durante 20 min en hielo. El resto del protocolo se realizó como en el apartado 11. Se recogieron 5 fracciones de 4 ml, de las que se cargaron 25 µl en un gel al 6% de poliacrilamida. Como se puede observar en la figura M4 C, todos los eluidos contenían la proteína de fusión Da-GST, que apareció como una doble banda. Realizamos un Western Blot según protocolos estándar, empleando el anticuerpo primario anti-Da. Ambas bandas fueron reconocidas por el anticuerpo anti-Da, de modo que es posible que la proteína GST se esté separando de la secuencia de Da en parte de las moléculas, dando lugar a una proteína de menor tamaño. Las fracciones 3, 4 y 5 se concentraron por ultrafiltración utilizando los dispositivos Amicon Ultra 10K (Millipore), y se determinó la concentración de proteínas con el kit Bio Rad DC Protein Assay.

Para el ensayo de Retardo en Gel, se emplearon los oligonucleótidos marcados con los fluoróforos Cy3 y Cy5, que emiten en color verde y rojo, respectivamente:

Stg prom Cy3 y Cy5: 5' TAGCTCAT**CAGCT**GATCGTGA 3'

5' TCACGAT**CAGCT**GATGAGCTA 3'

Stg prom Cy5:* 5' TAGCTCAT**actagt**ATCGTGA 3'

5' TCACGAT**actagt**ATGAGCTA 3'

El oligonucleótido mutado se generó cambiando las bases púricas por pirimidínicas (señaladas en negrita). Para hibridar las parejas de oligonucleótidos se pusieron 800 ng de cada uno en agua a 100° C tapados de la luz y se dejaron enfriar toda la noche. La reacción se llevó a cabo poniendo 50 ng de los oligonucleótidos de doble cadena, 10 µg (2 µl) de la proteína de fusión Da-GST y 4 µl de Tampón de Hibridación 5X (HEPES 50 mM pH 7,6, KCl 200 mM, EDTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1,5 mM) en un volumen final (Vf) de 20 µl. La reacción se mantuvo 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual se cargaron 15 µl de cada muestra en un gel al 6% (DNA Retardation Gel, Invitrogen) en tampón de carga (Novex Hi-Density TBE Sample Buffer). El gel se corrió en tampón TBE a 90V durante 3 h protegido de la luz y a 4° C. El resultado se analizó en un escáner de fluorescencia (Typhoon, Bio Rad), que permite visualizar la fluorescencia emitida por los fluoróforos Cy3 y Cy5 (Figura R16 B).

14. Clonaje de fragmentos de ADN

14.1. Clonaje del promotor mínimo de *stg* en pGL2

Se clonó un fragmento de 0,7 Kb, situado entre los nucleótidos -976 a -205 por encima del sitio de inicio de la transcripción de *string* (llamado *stg prom*). Para ello, se empleó como molde el ADN utilizado para generar la línea *stg 10.5* (*stg 10.5-pCasper*, cedido por el laboratorio de B. Edgar). Se amplificó el citado fragmento por PCR con la enzima KOD (Novagen) flanqueado por las enzimas KpnI en 5' y XhoI en 3', con los oligonucleótidos 5' GGTACCTGGGGCTCCACACTATTTTC 3' y 5' CTCGAGGATGGTAGTCCTTGGTTTTTGG 3'. El producto de PCR se sub-clonó en primer lugar en el vector PCR blunt (Zero Blunt PCR Cloning Kit, Invitrogen), aceptor de fragmentos con extremos romos de PCR, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después, se digirió 1 µg de ADN de la construcción *stg prom-PCR blunt* con las enzimas Asp718 (isoesquizómero de KpnI) y XhoI, y se ligó (siguiendo el protocolo descrito en el apartado 11) en una versión modificada del vector pGL2 que contiene un promotor de activación mínimo (pGL2-HS43, generado en el laboratorio de M. Freeman), de modo que el fragmento de promotor queda situado en posición 5' al promotor mínimo, dirigiendo su expresión (*stg prom-pGL2*). Los clones positivos se seleccionaron mediante chequeo por PCR, y se secuenciaron.

Para la mutación de las E-boxes presentes en el promotor mínimo de *stg*, diseñamos oligonucleótidos homólogos entre sí que no contenían los citados sitios de unión, de forma secuencial.

Para la delección del primer sitio de unión, se emplearon los oligonucleótidos

5' CGCCCATTAGCTCATATCGTGATCGGCCGG 3' y

5' CCGGCCGATCACGATATGAGCTAATGGGCG 3'

(homólogos al fragmento CGCCCATTAGCTCAT**CAGCTG**ATCGTGATCGGCCGG, pero sin el sitio CAGCTG, marcado en negrita).

Para la delección del segundo sitio de unión, se emplearon los oligonucleótidos

5' GGGTGC GGTATATAAAAACCTCGGCATATTCAGC 3' y

5' GCTGAATATGCCGAGGTTTTTATAACCGCACCC 3'

(homólogos al fragmento GGGTGC GGTATATAAAAAC**CAGCTG**CTCGGCATATTCAGC, pero sin el sitio CAGCTG)

Se empleó la enzima Pfu (Promega) para amplificar cada construcción mutante. Los productos de PCR se digirieron con la enzima DpnI (Roche), que sólo digiere el ADN metilado, de modo que elimina selectivamente el ADN usado como molde, que ha sido modificado por la bacteria hospedadora. La eliminación de los dos sitios de unión en la construcción *stg prom*-pGL2* se comprobó mediante secuenciación.

14.2. Generación de reporteros GFP del promotor mínimo de *stg*

Para la construcción de los reporteros *stg prom-eGFP* y *stg prom*-eGFP*, se amplificó el promotor mínimo usando la enzima KOD, a partir de los vectores *stg prom-pGL2* y *stg prom*-pGL2*, respectivamente, usando los oligonucleótidos 5' CACCTGGGGCTCCACACTCTTTTC 3' y 5' GAATTCGATGGTAGTCCTTGTTTT 3', y se clonó cada inserto en el vector pENTR/D-TOPO. Después, se recombinaron las construcciones *stg prom-pENTR* y *stg prom*-pENTR* en el vector pHP-eGFP, que posee sitios de recombinación delante del gen reportero GFP. La reacción se llevó a cabo como se describió en el apartado 13. Los clones positivos para las construcciones *stg prom-eGFP* y *stg prom*-eGFP* se seleccionaron por amplificación de los insertos por PCR y posteriormente se secuenciaron.

Para la construcción de los reporteros *stg prom-sal^{EPV}-eGFP* y *stg prom*-sal^{EPV}-eGFP* se amplificó el promotor de *stg* usando como molde los vectores *stg prom-pGL2* y *stg prom*-pGL2*, respectivamente. Se añadieron secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción NotI en 5' y EcoRI en 3' de cada fragmento, para proceder a clonarlos en el vector *sal^{EPV}-pENTR* (cedido por el laboratorio de J.F. de Célis), que posee un sitio NotI entre las regiones de recombinación del vector pENTR/D-TOPO y la región *sal^{EPV}*, y un sitio EcoRI al inicio de la secuencia *sal^{EPV}*. De este modo, el promotor de *stg* quedaba clonado en posición 5' a la región *sal^{EPV}*. Los oligonucleótidos empleados fueron 5' CAGTGC GCGCCGCTGGGGCTCCACACTAT 3' y 5' CAGTGAATTCGATGGTAGTCCTTGTTTT 3', donde las 4 primeras bases CAGT situadas antes del sitio de restricción sirvieron de secuencia "grapa" para la unión de la enzima de restricción. Los vectores *stg prom-sal^{EPV}-pENTR* y *stg prom*-sal^{EPV}-pENTR* se recombinaron con el vector pHP-eGFP, del modo descrito en el apartado 13. Los clones positivos para las construcciones *stg prom-sal^{EPV}-eGFP* y *stg prom*-sal^{EPV}-eGFP* se seleccionaron por amplificación de los insertos por PCR y posteriormente se secuenciaron.

Las cuatro construcciones descritas fueron inyectadas en embriones de *Drosophila* de genotipo *yw*; *M{eGFP.vas-int.Dm}ZH-2A* ; *M{RFP.attP}ZH-86Fb* (Crom 3R) por el servicio de Microinyección del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Las moscas procedentes de los embriones inyectados se cruzaron con moscas de genotipo *w*. La progenie que tuvo los ojos de color rojo (y que por lo tanto contenían las construcciones inyectadas que incluyen la secuencia del gen *w*

silvestre) se cruzó con moscas de genotipo *w*, *TM2/TM6B* para hacer líneas de tipo *w*, *stg-prom-X/TM6B*.

14.3. Clonación de *daughterless* en el vector *pAC5.1*

Se clonó la secuencia completa de *da* en el vector *pAC5.1*, que dirige la expresión bajo un promotor constitutivo. Para ello, se amplificó por PCR con la enzima KOD la secuencia de *da*, usando como molde el clon LD29375. Se emplearon los oligonucleótidos 5' GATATCATGGCGACCACTGAC 3' y 5' GCGGCCGCCTATTGCGGAAGC 3', que contenían en sus extremos las secuencias de restricción EcoRV en 5' y NotI en 3', sitios presentes en el sitio de policlonaje del vector. El producto de PCR purificado se ligó en el vector *pAC5.1* como se describió en el apartado 11. Los clones positivos *da-pAC5.1* se seleccionaron por digestión del inserto con las enzimas de restricción introducidas, y posteriormente se secuenciaron.

14.4. Construcción de los vectores *pUAS-CG34422-Nt* y *pUAS-CG34422-Ct*

La región N-terminal (Nt) se amplificó a partir de ADN genómico de moscas de genotipo silvestre. Se escogió la región codificante desde el inicio hasta el primer codón de STOP (Figura M3 B, en azul). Dado que el primer ATG y las siguientes 3 bases (CAG) se encuentran separadas por un intrón del resto de la secuencia (Figura M3 B, en gris claro), se incluyeron en el oligonucleótido 5', que fue: 5' CACCATGCAGCAAATGGACGATC 3'. Por el lado 3', se empleó el oligonucleótido 5' CTTACCCGATGGTGAGGCATCC 3', que no contenía el codón de STOP TGA, para no interrumpir la transcripción de la secuencia Flag, que se añadirá al final de la secuencia. La región Ct se amplificó usando como ADN molde el clon LD25641 (*CG34422-pOT2*). Se añadió el codón de inicio ATG en el oligo 5', y se eliminó el codón STOP TAG en 3', de forma que los oligos usados fueron 5' CACCATGCATCCTAGCGATGATTCC 3' y 5' GGCGCATATCTTGCCCTGCTG 3' (Figura M3 B, en verde). Los fragmentos amplificados por PCR con la enzima KOD se sub-clonaron en primer lugar en el vector *pCR-Blunt*, y después se introdujeron en el vector *pENTR/D-TOPO*. Los clones positivos se recombinaron con el vector *ptwf* (*pUAS-Flag*, Invitrogen), del modo descrito en el apartado 13. Este vector contiene la secuencia UAS antes del sitio de clonaje, de modo que permite la sobre-expresión de la secuencia clonada al combinarla con la proteína Gal4. Además, en posición C-terminal posee la secuencia que codifica para la proteína Flag, repetida 3 veces en tandem. Los clones positivos *CG34422-Nt-pUAS-Flag* y *CG34422-Ct-pUAS-Flag* se secuenciaron y se inyectaron en embriones de *Drosophila* de genotipo *yw*, donde se insertaron al azar en el genoma (la inyección fue realizada por servicio de Microinyección del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa). Las moscas procedentes de los embriones inyectados se cruzaron con moscas de genotipo *w*, y se seleccionaron los individuos de ojos rojos, que contenían la construcción inyectada (que poseen la secuencia del gen *w* silvestre). Después se mapearon, cruzándolas dos veces con moscas *w*; *If/CyO*; *MKRS/TM6B*, resultando que todos los individuos habían incluido las construcciones *UAS-CG34422-Nt* y *UAS-CG34422-Ct* en el

cromosoma II. Se generaron líneas estables de genotipo *w; UAS-CG34422 (Nt o Ct)/ CyO; MKRS/TM6B*.

15. Cultivos celulares y medición de actividad Luciferasa

Para los experimentos de expresión de Luciferasa dirigida por el promotor de *stg*, se empleó la línea celular de origen embrionario S2 de *Drosophila melanogaster*. Las células se cultivaron en medio Insect-XPRESS (Lonza), suplementado con FBS 10% y Gentamicina 50 µg/ml, en un incubador a 25° C. 2 x 10⁶ células sub-confluentes se transfectaron mediante electroporación, usando el medio de transfección Nucleofector (Lonza). En cada transfección se añadió una cantidad total de ADN de 2 µg, repartido entre las distintas condiciones: se transfectó 1 µg de vector pGL2 o *stg-prom-pGL2*, junto con cantidades variables de *da-pAC5.1* (entre 0,25 µg y 1 µg). Cuando la cantidad de *da-pAC5.1* era menor a 1 µg, se suplía con la cantidad adecuada de vector vacío pAC5.1, hasta llegar a 1 µg total. Además, a todas las transfecciones se les añadieron 60 ng del plásmido Renilla, que sirvió para estimar la eficacia de la transfección. Las células transfectadas se mantuvieron 24 h a 25° C, tras lo cual se procedió a medir la actividad de Luciferasa, empleando el kit Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega), que permite revelar por separado la actividad Luciferasa y la actividad Renilla. Para la medida de la luminiscencia emitida por ambos plásmidos, se empleó un lector de placa (BMG Labtech). Para cada transfección, se realizaron las medidas por triplicado. Se dividió la actividad de Luciferasa entre la actividad Renilla para eliminar las diferencias debidas a la posible variabilidad en el número de células transfectadas, y la eficacia de cada transfección. Las medidas se representaron relativas a la emisión producida por el plásmido pGL2 vacío. Los experimentos se realizaron por triplicado en 3 ensayos independientes.

16. Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa (qPCR)

El aislamiento de ARN se realizó a partir de 60 discos imaginales de ala, que se extrajeron de las larvas mantenidas en frío, y se recolectaron en PBS tratado con DEPC en hielo durante un tiempo máximo de 30 min. Se eliminó el PBS tras centrifugar el tubo con los discos 5 min a máxima velocidad a 4° C. A continuación, se añadieron 300 µl del reactivo TriPure (Roche). Las muestras se fueron acumulando a -80° C, para realizar la purificación del ARN el mismo día. Para ello, tras homogeneizar la muestra con la pipeta automática, se centrifugó cada muestra 10 min a máxima velocidad a 4° C. Se añadieron 0,2 volúmenes de cloroformo al sobrenadante y se agitaron con un vortex 1 min. Se centrifugó de nuevo 15 min a máxima velocidad a 4° C. Se recogió la fase acuosa, a la que se añadieron 0,8 volúmenes de isopropanol y se mezcló por inversión. A continuación, se mantuvieron las muestras mínimo 1 h a -20° C. Después, se centrifugaron 15 min a máxima velocidad a 4° C, y se eliminó el sobrenadante. Después se lavaron con EtOH 70% (preparado con H₂O tratada con DEPC), se centrifugaron de igual modo durante 5 min y se retiró el sobrenadante, dejando secar al aire el precipitado. Después, se resuspendió en 10 µl de H₂O DEPC.

Se eliminaron los posibles restos de ADN mediante el sistema DNA-free de Ambion, por el cual se incubaba cada muestra con DNaseI durante 30 min a 37° C, en un volumen de 25 µl. Tras la inactivación de la enzima, se centrifuga la muestra 5 min a temperatura ambiente a 10.000 g, conservando el sobrenadante que contiene el ARN. La concentración del mismo se midió en un espectrofotómetro (Nanodrop).

Los experimentos de PCR cuantitativa se llevaron a cabo en el servicio de Genómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa o el servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid. Para realizar la Transcripción Reversa (RT), se utilizó 1 µg de ARN total, que se pasó a ADNc con el kit Superscript III First Strand Synthesis Supermix (Invitrogen). Los oligonucleótidos se diseñaron usando la herramienta ProbeFinder de Roche, intentando que fueran siempre “*intron spanning*”, es decir, que entre el oligonucleótido 5' y el 3' hubiera un intrón, de modo que se distinga la amplificación del ADNc de la de una posible contaminación con ADN genómico. Para los experimentos de medición de la expresión de *string*, se emplearon los oligonucleótidos:

stg: 5' CAGCATGGATTGCAATATCAGTA 3' y 5' ACGACAGCTCCTCCTGGTC 3'

Como genes normalizadores (de expresión constitutiva) se escogieron los genes *act42a*, *αtub84b* y *rpl32*. Se utilizaron los oligonucleótidos:

act42a: 5' TTCACCGCAAGTGCTTCTAA 3' y 5' GTGTGTTTCGATGAGGAACGA 3'

αtub84b: 5' ACACTTCCAATAAAAACTCAATATGC 3' y 5' CCGTGCTCCAAGCAGTAGA 3'

rpl32: 5' CGTTTACTGCGGCGAGAT 3' y 5' GCGCTCGACAATCTCCTT 3'

Todos ellos mantuvieron su expresión estable en las distintas condiciones analizadas, y se escogió *act42A* para normalizar los datos. A la expresión de *stg* en el control se le otorgó valor 1, y se comparó con la expresión del resto de condiciones experimentales. Cada experimento se realizó con al menos 3 muestras independientes.

Para el experimento de medición de la expresión de *emc* y *da* durante el desarrollo (Figura R22), se emplearon los oligonucleótidos:

emc: 5' CCCAAGAACAGGAAGCTCAC 3' y 5' CGCAGATGTAGTCGATGACG 3'

da: 5' AGCTACGCCAGCGAAATG 3' y 5' GTCGTCCAGTCGCTCCTC 3'

Como genes normalizadores, se estudió la expresión de los genes *act42a*, *ef1*, *mnf*, *rpl32*, *rps20*, *αtub84b*, *18s*, con los siguientes oligos:

act42a: 5' GCGTCGGTCAATTCAATCTT 3' y 5' AAGCTGCAACCTCTTCGTCA 3'

ef1: 5' GCGTGGGTTTGTGATCAGTT 3' y 5' GATCTTCTCCTTGCCCATCC 3'

mnf: 5' GAGCAGAAGAGCCCCTACCT 3' y 5' AATGAAACCCTGACGTGGAC 3'

rpl32: 5' ATGCTAAGCTGTGCGACAAATG 3' y 5' GTTCGATCCGTAACCGATGT 3'

rps20: 5' TGTGGTGAGGGTTCCAAGAC 3' y 5' GACGATCTCAGAGGGCGAGT 3'

αtub84b: 5' TGTCGCGTGTGAAACACTTC 3' y 5' AGCAGGCGTTTCCAATCTG 3'

18s: 5' CTGAGAAACGGCTACCATC 3' y 5' ACCAGACTTGCCCTCCAAT 3'

Los genes que mantuvieron más estable su expresión fueron *rpl32*, *rps20* y *αtub84b*, escogiéndose este último para normalizar los datos. Los niveles de expresión del ARNm de los genes *da* y *emc* se relativizaron respecto a los niveles que mostraron en estadio de larva 2, al que se le otorgó valor 1. El experimento se realizó con 3 muestras independientes.

17. Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina seguidos de qPCR (ChIP-qPCR)

Para realizar este ensayo, seguimos el protocolo publicado en Sandmann *et al.*, (2006) pero a menor escala.

Extracción de cromatina:

Se recogieron 200 mg de embriones de genotipo silvestre en puestas de 24 h, se decorionaron con hipoclorito sódico al 50% durante 3 min, y se lavaron con agua. Se lavaron por agitación con 4 ml PBS/ Tritón-X100 0,1%, y se centrifugaron 1 min a 500 g. Se eliminó el sobrenadante y se fijaron los embriones en una solución que contenía 670 µl de solución *cross-linking* (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 0,5 mM, NaCl 100 mM, pH 8) + 33 µl de Formaldehído al 40% + 2 ml de Heptano. Se agitó el tubo vigorosamente durante 15 min a temperatura ambiente. Después, se centrifugó la muestra a 1000 g 2 min, y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron los embriones en 2 ml de PBS 1X, Glicina 125mM y Tritón X-100 0,01%. Se centrifugaron 1 min a 500 g, eliminando el sobrenadante. Este paso se realizó 2 veces. Se resuspendieron los embriones en 2 ml de PBS 1X y Tritón-X-100 0,1% frío, dejando que sedimenten los embriones. Después se machacaron los embriones 5-10 veces en 1 ml de PBS 1X y Tritón-X-100 0,1% frío con inhibidores de proteasas, empleando un homogeneizador a mano. Se centrifugó 1 min a 400 g dos veces seguidas, conservando el sobrenadante. Se añadió 1 ml de Tampón de Lisis Celular frío (PIPES 5 mM pH 8, KCl 85 mM, NP-40 0,5%) con inhibidores de proteasas. Se homogeneizaron las células durante 30 seg en hielo. Se centrifugó la muestra a 19000 g 4 min a 4º C para sedimentar los núcleos. El precipitado se resuspendió en Tampón de Lisis Nuclear frío (Tris-HCl 50 mM pH 8,1, EDTA 10 mM, SDS 1%) con inhibidores de proteasas, y se incubó 20 min a 4º C. La muestra se dividió en alícuotas de 100 µl, que se sonicaron en 30 ciclos de 30 segundos ON/ 30 segundos OFF, en un sonicador Bioruptor NextGen (Diagenode). Tras la sonicación, se mezcló el contenido de los 10 tubos, y se centrifugaron a 16000 g 10 min a 4º C. Se transfirió la cromatina en 2 alícuotas de 450 µl a tubos de criocongelación, que se congelaron en N₂ líquido y se guardaron a -80º C hasta su utilización. Se reservó una alícuota de 50 µl para el control de calidad.

Control de calidad de la cromatina:

Este paso sirve para saber si la fragmentación de la cromatina ha sido adecuada. Se busca la obtención de fragmentos de cromatina que se encuentren en un rango menor a 1 Kb, con la mayoría de los fragmentos en torno a 500 pb.

Se partió de la muestra de 50 µl reservada para el control de calidad. Se le añadió RNasa, en c.f. 50 µg/ml, y se incubó a 37º C 30 min. Después, se añadieron 5 µl de SDS 10%, 2,5 µl de Proteinasa

K (c.f. 20 mg/ml), y se incubó toda la noche a 37° C en un baño de agua. Después, se incubó la muestra a 65° C durante 6 horas (o a 95° C 30 min si era sólo para chequear la fragmentación de la cromatina (protocolo de control de calidad)). Se purificó el ADN de la muestra añadiendo 300 µl de Fenol: Cloroformo: Isoamílico (Roche). Se utilizaron las columnas Phase Lock Tubes (Eppendorf), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. A los 100 µl que resultan tras este paso, se añadió 1,25 µl de Glycogen (20 mg/ml, Roche), 25 µl de AcNa 3M pH 5,2, y 550 µl de EtOH 100%. La mezcla se incubó a -80° C durante al menos 30 min. Luego se centrifugó a 15000 g 15 min a 4° C, para precipitar el ADN. El precipitado se lavó con 1 ml de EtOH 70%, y se centrifugó a 15000 g 10 min a 4° C. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se dejó secar al aire y se resuspendió en 50 ml de H₂O miliQ. Se inocularon 20 µl de la muestra en un gel al 1 % de agarosa con BrEt para visualizar la correcta fragmentación de la cromatina (Figura M4 D).

Inmunoprecipitación:

Por cada inmunoprecipitación, se tomaron 25 µl de Proteína A Agarosa con espermatozoos de salmón (Millipore), y se lavaron con 1 ml de Tampón RIPA (EDTA 1 mM pH 8, Tris-HCl 10 mM pH8, NaCl 140 mM, SDS 0,1%, DOC 0,1%, Tritón X-100 1%). Se centrifugó a 1000 g 2 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 100 µl de RIPA. La cromatina descongelada en hielo se centrifugó a máxima velocidad 1 min a 4° C para precipitar el SDS cristalizado. Se separaron alícuotas de 200 µl de cromatina, a las que se añadió 300 µl de tampón TE frío (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Además se añadió a cada muestra: 100 µl de Tritón X-100 10% (c.f. 1%), 100 µl de DOC 12% (c.f. 1,2%), 100 µl de SDS 1% (c.f. 0,1%), 100 µl NaCl 1,4 M (c.f. 0,14 M). A cada muestra se añadieron los 100 µl de Proteína A Agarosa previamente tratados, y se incubaron durante 1 h a 4° C en una noria para eliminar interacciones inespecíficas. Después, se centrifugaron las muestras a 1000 g 2 min a 4° C, descartando el precipitado. Se añadió el anticuerpo anti-Da (5 µl por muestra, 1:200), que se incubó toda la noche a 4° C en una noria. Además, se lavaron otros 25 µl de proteína A Agarosa con RIPA + BSA (c.f. 1 mg/ml), que se dejaron toda la noche bloqueando en una noria a 4° C.

Para purificar los inmunocomplejos, se centrifugaron los tubos con Proteína A Agarosa a 1000 g 2 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con 100 µl de RIPA. Se añadió la Proteína A Agarosa a cada inmunoprecipitado, y se mantuvo 3h a 4° C en una noria. Después, se precipitó la proteína A por centrifugación a 1000 g 2 min, lavándose cada muestra con 1 ml de RIPA frío. A continuación, se realizaron lavados con las siguientes soluciones frías, cada uno seguido de centrifugación e incubación a 4° C 10 min en la noria: 1X RIPA, 4X RIPA 500 (EDTA 1mM pH 8, Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 500 mM, SDS 0,1%, DOC 0,1%, Tritón X-100 1%), 1X LiCl (LiCl 250 mM, DOC 0,5%, EDTA 1mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, NP-40 0,5%), 2X TE. Por último, se resuspendieron las esferas en 100 µl de TE con RNasa A (c.f. 50 µg/ ml), que se incubó a 37° C 30 min. A partir de este punto, se procedió a purificar el ADN inmunoprecipitado, repitiendo el protocolo de control de calidad. El precipitado final se resuspendió en 10 µl de H₂O miliQ y se guardó a -20° C hasta la realización del experimento de PCR cuantitativa.

Analizamos 3 regiones distintas candidatas a ser reguladas por Da. Como control positivo empleamos un fragmento del promotor de *achaete* (Crom X: 262,623 – 265,355) que contenía dos

sitios de unión para Da. Dentro de la región reguladora de *stg*, estudiamos la región promotora localizada en Crom 3R: 25,081,039 - 25,081,121 (*stg prom*, Figura R14 A y C), y un fragmento de la región incluida en las líneas *stg-107-112-LacZ* y *GMR_32F08* (Janelia), localizado en Crom 3R: 25,111,328 - 25,111,401 (*stg 25.111*, Figura R14)). Como control negativo usamos el gen *CG12255*, que codifica para la Proteína Cuticular 72Eb (Crom 3L: 16,358,278 - 16,358,337), que no contiene ningún sitio de unión para Da.

El experimento de PCR cuantitativa se realizó en la unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid, en un equipo AB 7900HT (Applied Biosystems), usando los oligonucleótidos:

ac promoter: 5' GGTATCAGGGCCTAGGGATCC 3' y 5' GATCCTTCAGTGATGATGCTGTTG 3'

stg prom: 5' CGCGCCCATTAGCTCATC 3' y 5' CGAATGTGCTGAATATGCCG 3'

stg 25.111: 5' GTTTGCTTTAGCGGGAACTC 3' y 5' CGGATTGCGCAAGAACAG 3'

CG12255: 5' CCGTGGATGGTGTGATCC 3' y 5' TCTGGGTTTCGCCATTTG 3'

Se cargaron 2 µl de ADN en cada experimento. Además, se cargaron 5 ng de muestra de cromatina sin inmunoprecipitar (procedente del control de calidad), para certificar que los oligonucleótidos funcionaban bien, y que las secuencias a analizar estaban disponibles en la muestra.

Para estimar las diferencias en el contenido en ADN entre los distintos inmunoprecipitados, comparamos los resultados obtenidos para las regiones del promotor de *stg* y *ac* con los datos obtenidos para el *CG12255*. Para ello, sustrajimos el valor de Cq (ciclo de amplificación) de cada muestra a la media de los Cq obtenidos para el *CG12255*, obteniendo el valor ddCq. Calculamos el valor de RQ (cantidad relativa de molde) usando la fórmula $RQ = -2^{ddCq}$. Los resultados proceden de 3 experimentos independientes.

18. Análisis estadístico

Salvo que se especifique otro dato, se analizaron al menos 10 alas o discos imaginales de ala de individuos del mismo sexo de cada genotipo. Para los experimentos de PCR cuantitativa, FACS y ChIP-qPCR se analizaron mínimo 3 ensayos independientes. Los datos se expresaron como la media +/- el Error Estándar Medio (Desviación Estándar/ Raíz Cuadrada de n, siendo n el número de datos). Los datos fueron comparados usando una prueba T (T de Student). Se consideraron tres rangos de significación: p-valor<0,05, p-valor<0,01 y p-valor<0,001. Todos los datos fueron almacenados y calculados utilizando el programa Microsoft Excel 2011. Las figuras fueron tratadas con el programa Adobe-Photoshop™ CS4.

Resultados

PRIMERA PARTE: Función de las proteínas bHLH Extramacrochaetae y Daughterless en el control de la proliferación y la progresión del ciclo celular

1. Estudio de los requerimientos del gen *extramacrochaetae* durante el desarrollo del ala y el notum de *Drosophila melanogaster*

1.1. Descripción de los fenotipos de falta de función de *emc* durante el desarrollo del disco imaginal de ala

El requerimiento de la función de *emc* durante el desarrollo de los discos imaginales de ala de *Drosophila* ha sido ampliamente demostrado mediante distintos análisis genéticos (Botas *et al.*, 1982; Cubas *et al.*, 1991; Cubas y Modolell, 1992; Van Doren *et al.*, 1992; Cubas *et al.*, 1994; Ellis, 1994; de Celis *et al.*, 1995; Baonza y García-Bellido, 1999). Así, se ha descrito que clones de células mutantes para alelos nulos de *emc* son letales celulares. Cuando se analizaron condiciones alélicas más débiles, como clones para el alelo hipomorfo *emc*¹ o combinaciones heterocigóticas de este alelo sobre la deficiencia *Df(3L)emc*^{E12}, se observó que estos clones eran en todos los casos más pequeños que los clones control (de Celis *et al.*, 1995). Además, a diferencia de lo que ocurría con los clones control, los clones de células mutantes para *emc* eran estrechos y alargados y se localizaban preferentemente sobre las venas. Cuando a las células mutantes para *emc* se les daba una ventaja proliferativa, generando clones *emc*⁻ *M*⁺ en un fondo heterocigótico para la mutación *Minute*, se observó que estos clones eran capaces de ocupar territorios mayores del ala. En estas condiciones, los clones producían una fuerte reducción del tamaño de las regiones que ocupaban, llegando incluso a producir la fusión de las venas adyacentes y, por consiguiente, la eliminación de territorios completos de intervenera (de Celis *et al.*, 1995). Este resultado reveló que la adquisición de una ventaja proliferativa permitía a las células mutantes para *emc* ocupar territorios grandes, pero finalmente estas células eran incapaces de seguir dividiéndose, dando lugar a la eliminación completa del tejido.

Para comprender mejor el origen de los fenotipos adultos producidos por la falta de función de *emc*, generamos clones homocigóticos para el alelo hipomorfo *emc*¹ y el alelo nulo *emc*^{AP6}, y los visualizamos en el disco de ala de larvas de tercer estadio. Los clones mutantes para *emc*¹ inducidos a las 60 ± 12 h TPH y analizados 60 ± 12 h después, resultaron ser un 57% más pequeños que los clones control generados en paralelo (10,3 ± 0,61 células en clones *emc*¹ frente a 23,8 ± 1,2 células en clones control, Figura R1 A-C). Cuando analizamos los clones para el alelo nulo *emc*^{AP6} (Bhattacharya y Baker, 2012), encontramos que en la mayoría de los casos las células mutantes no habían proliferado, y sólo aparecía el clon gemelo control (Figura R1 D, E). En las raras ocasiones en las que observamos clones mutantes, éstos eran redondeados y su tamaño era significativamente menor que el de los clones control (Figura R1 D-F). Estos resultados indican que la incapacidad para crecer con normalidad de las células con insuficiencia para *emc* ocurre durante todo el desarrollo.

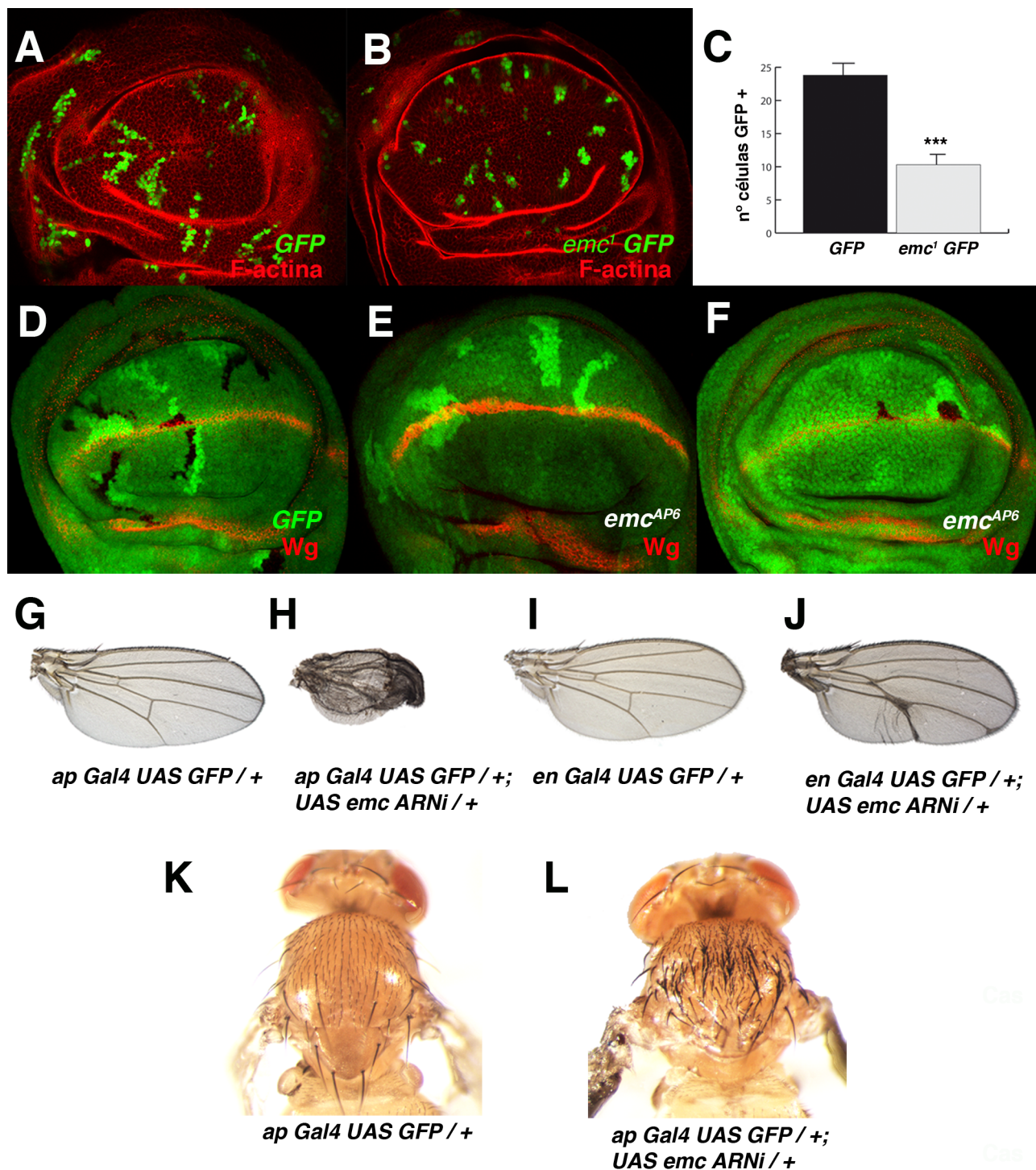


Figura R1: Fenotipos causados por la falta de función de *emc*. (A-C) Clones control (A) y *emc¹* (B) marcados por la expresión de GFP (verde) en discos de ala de tercer estadio larvario. Los discos se tiñeron además con Faloidina (en rojo). (C) Cuantificación del número de células por clon (n=40 clones por genotipo, ***p-valor<0,001 respecto al control). Los clones *emc¹* fueron un 57% más pequeños que los controles. (D-F) Clones control (D) y *emc^{AP6}* (E, F) marcados por la ausencia de GFP. Los clones hermanos aparecen marcados con doble GFP. Nótese que mientras que los clones control y sus hermanos eran similares en tamaño, los clones *emc^{AP6}* no crecieron en absoluto (E) o fueron pequeños y redondeados (F). (G-J) Alas adultas que muestran el efecto del ARNi de *emc*, expresado con *ap-Gal4* (*ap-Gal4 UAS-GFP / +; UAS-emc^{ARNi} / +*) (H) o *en-Gal4* (*en-Gal4 UAS-GFP / +; UAS-emc^{ARNi} / +*) (J) comparados con sus controles *ap-Gal4 UAS-GFP / +* (G) y *en-Gal4 UAS-GFP / +* (I). En ambos casos se produjo una reducción del tamaño de la región mutante, y la fusión parcial de las venas. (K, L) Imagen del notum de moscas control *ap-Gal4 UAS-GFP / +* y mutantes *ap-Gal4 UAS-GFP / +; UAS-emc^{ARNi} / +*. La reducción de la expresión de *emc* causó un aumento del número de quetas, fenotipo similar al ocasionado por alelos de falta de función de *emc*.

Al analizar los efectos producidos por la sobre-expresión de un UAS-ARN de interferencia (UAS-ARNi) diseñado para reducir la cantidad de ARN mensajero de *emc*, observamos que reproducía los defectos en el crecimiento descritos para alelos mutantes de *emc*. Así, encontramos que la expresión del UAS-*emc*^{ARNi} bajo el control del promotor del gen *apterous* (*ap-Gal4*; UAS-*emc*^{ARNi}), que activa su expresión en todas las células del compartimento dorsal del disco, ocasionaba una fuerte reducción del tamaño del ala, especialmente del compartimento dorsal, además de la fusión de las venas 4 y 5. También observamos la aparición de quetas por toda la superficie dorsal del ala (Figura R1 G, H). Del mismo modo, la expresión del UAS-*emc*^{ARNi} en el compartimento posterior, utilizando la línea *engrailed-Gal4*, daba lugar a una reducción del tamaño de dicho compartimento, y la fusión de las venas 4 y 5 (Figura R1 I, J).

La expresión del UAS-*emc*^{ARNi} con *ap-Gal4* nos permitió además observar el fenotipo al que da lugar la disminución de los niveles de *emc* en el notum. Como ya hemos comentado, Emc tiene un papel importante en la especificación de los órganos sensoriales. Su expresión es alta en células indiferenciadas con proliferación activa, y está inhibida en aquellas células que adquieren un destino neural. Cuando redujimos los niveles de *emc* en el territorio dorsal del notum, se produjo un marcado aumento de la aparición de macroquetas y microquetas (Figura R1 K, L), tal y como se había descrito previamente para la falta de función de este gen (Ellis *et al.*, 1990; Garrell y Modolell 1990, Cubas y Modolell, 1992). Este fenotipo, junto con los obtenidos en el ala, valida la utilización del ARNi de *emc* como herramienta alternativa a los mutantes de falta de función para estudiar su papel durante el desarrollo del ala.

1.1.1. Análisis de los fenotipos de falta de función de *emc* en relación con la proliferación y el ritmo de la división celular

Para analizar las causas del defecto de crecimiento producido por la falta de función de *emc*, estudiamos el patrón de proliferación que presentaban las células con insuficiencia para *emc* durante el desarrollo de los discos imaginales de ala. Para ello, en primer lugar disminuimos la expresión de *emc* en las células dorsales del disco sobre-expresando el UAS-*emc*^{ARNi} bajo el control de *ap-Gal4* UAS-GFP, y comparamos el patrón de proliferación de las células mutantes con respecto a las células silvestres del compartimento ventral. Para este análisis, estudiamos el número de células en mitosis en discos de tercer estadio larvario, utilizando un anticuerpo anti-Fosfo-Histona-3 (PH3) que marca las células en división. Además, utilizamos un anticuerpo anti-Wingless (Wg) con el fin de delimitar la región presuntiva de ala. El análisis del número de células positivas para la tinción de PH3 respecto al área delimitada por la expresión de Wg reveló un descenso significativo del número de células en división debido a la disminución de la función de *emc* (índice mitótico: $1,19 \pm 0,22$ en el control *ap-Gal4* UAS-GFP frente a $0,78 \pm 0,08$ en los discos *ap-Gal4* UAS-GFP; UAS-*emc*^{ARNi}, Figura R2 A-B, n=10 discos por genotipo, p-valor<0,05).

Una explicación a estos resultados podría ser que las células con insuficiencia de *emc* se estuvieran dividiendo más lentamente. Para estudiar esta posibilidad, analizamos el tiempo de

duplicación celular de los clones mutantes *emc*, con respecto a clones silvestres. El tiempo de duplicación celular se refiere al tiempo que tarda una población de células en duplicar su número en un contexto específico (Neufeld *et al.*, 1998a). Para realizar esta medida, generamos clones mutantes del alelo *emc*¹ y clones silvestres a las 60 ± 12h TPH y los analizamos 60 ± 12 h u 84 ± 12 h después. Los clones mutantes para *emc* presentaron un retraso en su tiempo de duplicación celular de 4,4 h

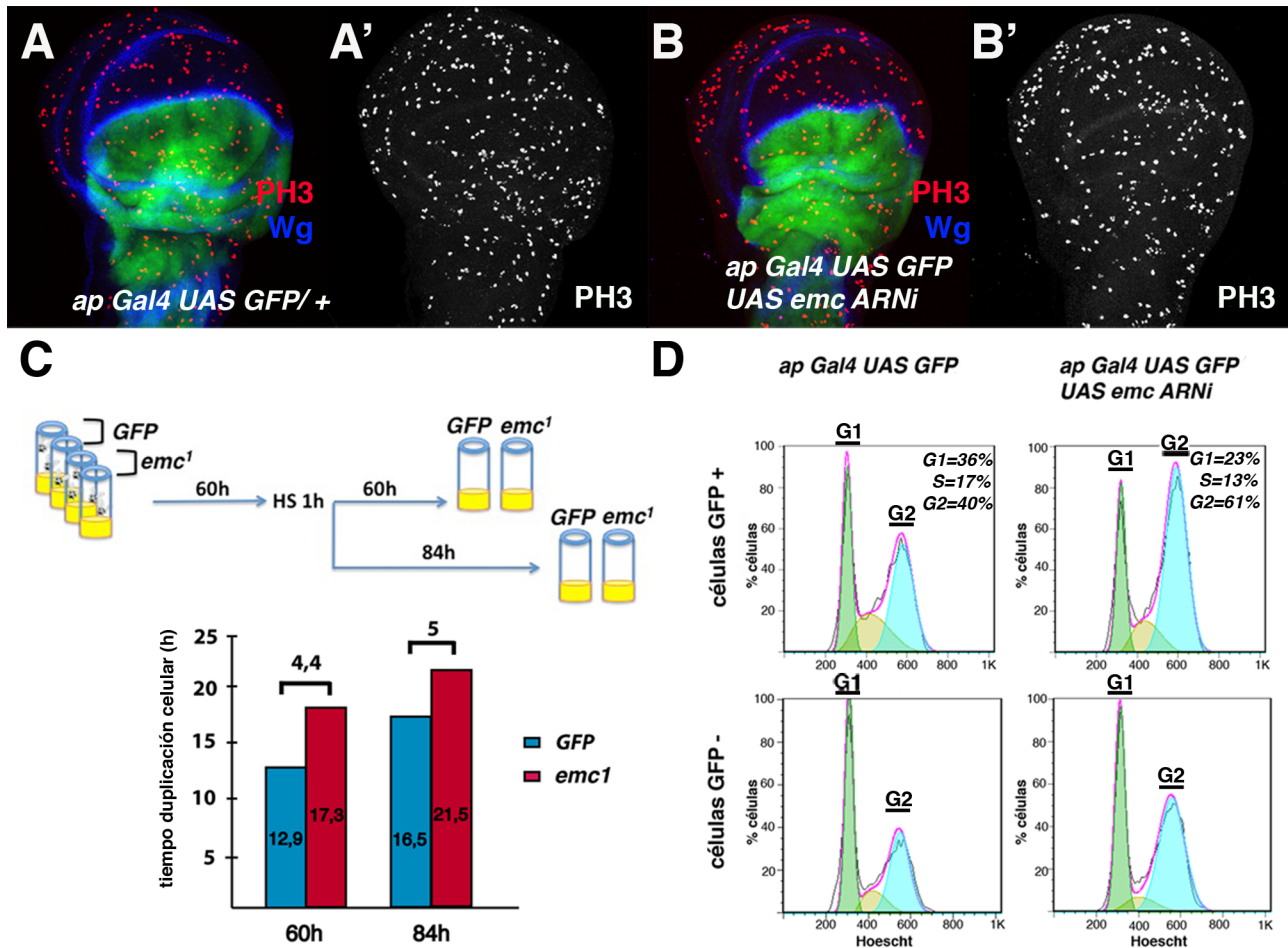


Figura R2: Influencia de la falta de función de *emc* sobre la proliferación y el ciclo celular. (A, B) Discos control (*ap-Gal4 UAS-GFP/+*) y mutantes (*ap-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-emc^{ARNi}/+*) de alas tercer estadio larvario en los que se observa la expresión de PH3 (en rojo en A y B y en gris en A', B) y de Wg (en azul en A y B) que delimitó el territorio putativo de ala. El compartimento dorsal de los discos con expresión reducida de *emc* es más pequeño que el de los controles. (C) Representación esquemática del experimento de cuantificación del tiempo de duplicación celular. Se realizaron puestas de 24 h de genotipos control (*GFP*) y *emc*¹, y se mantuvieron a 25° C durante 60 ± 12 h, tras lo cual se les aplicó un choque térmico (*Heat Shock*, HS) durante 1 h a 37° C. Tras 60 ± 12 h u 84 ± 12 h a 25° C se calculó el tiempo de duplicación celular para los clones presentes en los discos imaginales de ala, en los dos tiempos de análisis. Las células mutantes para *emc* presentaron un tiempo de duplicación celular aumentado 4,4 ó 5 h, respecto a los controles. (D) Perfiles del ciclo celular de células de los discos imaginales localizadas en el compartimento dorsal (GFP+) y de células del compartimento ventral (GFP-), de discos de genotipos *ap-Gal4 UAS-GFP/+* (gráficos de la izquierda) y *ap-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-emc^{ARNi}/+* (gráficos de la derecha). Se han señalado las fases G1 y G2 del ciclo, y los porcentajes medios de células GFP+ que se encontraron en cada fase para ambos genotipos. En el caso de las células GFP-, los porcentajes fueron similares a los que mostraron las células GFP+ del control *ap-Gal4 UAS-GFP/+*. La expresión del ARNi de *emc* causó un aumento del número de células en la fase G2 del ciclo (n=4 experimentos independientes, p-valor<0,05).

respecto a los clones silvestres cuando se analizaron a las 60 ± 12 h tras la inducción. Así, mientras que el tiempo de duplicación de la población silvestre fue de 12,9 h, la población mutante tardó 17,3 h en duplicar su tamaño. Esta diferencia se elevó hasta 5h cuando los clones se analizaron a las 84 ± 12 h tras su inducción, hecho que pone de manifiesto que el ciclo celular se ralentiza a medida que la edad del disco aumenta y se acerca la entrada en metamorfosis (Figura R2 C).

Estos resultados indican que las células que presentan una insuficiencia de *emc* no son capaces de dividirse al mismo ritmo que las células silvestres, lo cual ocasiona un defecto en el número de células que componen el ala.

1.1.2. Papel de la muerte celular en los fenotipos de falta de función de *emc*

El reducido tamaño de los clones mutantes para *emc* podría deberse a varias causas, además del enlentecimiento del ciclo celular que acabamos de describir. Una posibilidad es que la falta de función de *emc* diera lugar a un incremento de la muerte celular. Para comprobar si la muerte celular contribuía al fenotipo producido por la insuficiencia de *emc*, bloqueamos la apoptosis en células mutantes para *emc*. Para ello utilizamos la deficiencia *Df(3L)H99*, que elimina los genes pro-apoptóticos *reaper*, *hid* y *grim*, y que se ha comprobado que bloquea eficientemente la apoptosis en *Drosophila* (White *et al.*, 1994). Generamos clones *emc¹ M⁺* y *emc¹ Df(3L)H99 M⁺* a las 60 ± 12 h TPH y comparamos los fenotipos producidos por ambos tipos de clones en alas adultas. Se ha descrito que los clones *M⁺* en un fondo *M⁻* heterocigótico tienden a ocupar regiones completas de

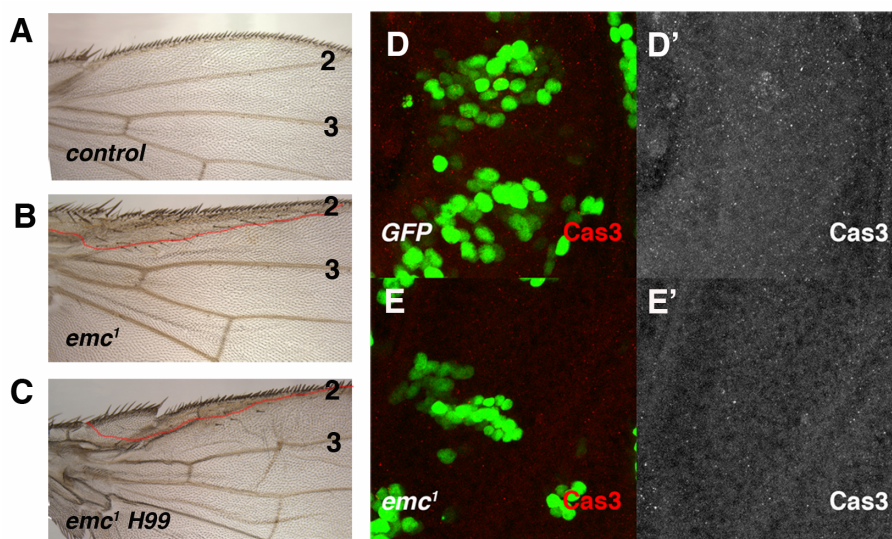


Figura R3: Papel de la muerte celular en los fenotipos producidos por la falta de función de *emc*. (A-C) Imágenes representativas de un ala control (A), una con un clon *emc¹* (B) y una con un clon *emc¹Df(3L)H99* (C). Las venas 2 y 3 aparecen señaladas y los clones se encuentran delimitados por una línea roja. Los clones observados en B y en C dan lugar a una pérdida de tejido que provoca la fusión de la vena 2 con el margen del ala. (D, E) Clones control (*GFP*, en D) y *emc¹* (E) marcados por la presencia de GFP (en verde) en discos de ala de tercer estadio larvario. Los discos muestran la expresión de Caspasa 3 (*Cas3*, en rojo en D y E y en gris en D' y E'). No se observó muerte celular en estos discos.

intervenía, de manera que, para definir el tamaño de los clones analizados, estudiamos el número de regiones de intervenía que ocupaban (de Celis *et al.*, 1995). El tamaño de ambos tipos de clones (*emc¹ M⁺* y *emc¹ Df(3L)H99 M⁺*) fue idéntico y significativamente menor al de los controles *mwh M⁺* ($1,3 \pm 0,63$ regiones de intervenía en clones *emc¹ Df(3L)H99 M⁺* frente a $1,3 \pm 0,7$ en clones *emc¹ M⁺*). Además, ambos tipos de clones daban lugar a la fusión de las venas adyacentes, eliminando territorios completos de intervenía (Figura R3 A-C).

Estos resultados, unidos al hecho de que en discos de ala que contenían clones homocigóticos para el alelo *emc¹* no encontramos un incremento de células apoptóticas (marcadas con anti-Caspasa 3, Figura R3 D, E), indican que la muerte celular no juega un papel relevante en los fenotipos producidos por la falta de función de *emc*.

1.1.3. Análisis de los fenotipos de falta de función de *emc* en relación con la progresión del ciclo celular

Un descenso en el ritmo de la división celular podría deberse a que todas las fases del ciclo celular estuvieran retrasadas por igual, o a que las células se estuvieran deteniendo en alguna fase concreta del ciclo. Para distinguir entre estas dos posibilidades, analizamos la proporción de células que se encontraban en cada fase del ciclo en condiciones de falta de función *emc*. Para ello, utilizamos la técnica denominada FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*), que permite analizar el perfil que presenta el ciclo celular de una población de células. En este caso, se separaron poblaciones de células de disco de ala mutantes para *emc* de las silvestres en base a su expresión de GFP, y se analizó el perfil de ciclo celular que presentaba cada una. Los clones mutantes *emc¹* presentaron un tamaño demasiado pequeño para obtener un rendimiento de células GFP + suficiente para hacer un análisis adecuado, por lo que utilizamos discos *ap-Gal4 UAS-GFP; UAS-emc^{ARNi}*, que contenían regiones grandes de tejido con niveles disminuidos de *emc*, y los comparamos con discos control *ap-Gal4 UAS-GFP*. El análisis del perfil del ciclo celular del compartimento dorsal, que expresaba el *UAS-emc^{ARNi}* (GFP +), con respecto al compartimento ventral (GFP -), o bien con respecto al perfil obtenido de discos de genotipo control, reveló que la reducción de *emc* daba lugar a un incremento de la proporción de células en la fase G2 del ciclo (61% frente a 40% en los controles, Figura R2 D).

El gen *apterous* dirige la expresión del *UAS-emc^{ARNi}* en todo el compartimento dorsal del disco de ala, incluyendo la región del notum. Como se ha mostrado en el apartado 1.1, la insuficiencia de *emc* en el notum da lugar a un incremento de quetas. Las células precursoras de las quetas permanecen en la fase G2 hasta el momento de entrada en diferenciación, de modo que al haber sobre-expresado *UAS-emc^{ARNi}* con *ap-Gal4*, es posible que el incremento del número de células en la fase G2 observado en esta condición mutante, pudiera deberse al aumento de células precursoras de quetas producido por la insuficiencia de *emc*. Para estudiar esta posibilidad, se realizó de nuevo un análisis de la progresión del ciclo celular utilizando la línea *nubbin-Gal4* (*nub-Gal4*), que induce la expresión del *UAS-emc^{ARNi}* únicamente en el territorio presuntivo de ala. Con este experimento, obtuvimos resultados similares a los observados con *ap-Gal4* (datos no mostrados).

Nuestros datos indican que la reducción de los niveles de *emc* produce la acumulación de células en la fase G2 del ciclo celular.

1.1.4. Estudio del papel de la proteína reguladora del ciclo celular String en los defectos en la proliferación causados por la falta de función de *emc*

Los resultados obtenidos sugieren que *emc* podría estar interaccionando directa o indirectamente con proteínas reguladoras del ciclo celular, en concreto de la transición G2/M. Como se describió en el apartado 5 de la Introducción, la entrada en mitosis es un proceso controlado directamente por el estado de fosforilación del complejo Ciclina B/Cdk2 (CycB). Este complejo se encuentra en estado fosforilado e inactivo durante la fase G2, de modo que para que se produzca la transición G2/M, es necesario que pase a estado activo, lo cual se produce cuando se desfosforila parcialmente. La proteína encargada de realizar este proceso es la fosfatasa String (Stg, ortólogo de Cdc25 en vertebrados). El aumento de expresión temporal de *stg* al final de la fase G2 es imprescindible para que ocurra la división celular (Neufeld *et al.*, 1998a).

Con el fin de determinar si existía alguna relación funcional entre *emc* y *stg* realizamos interacciones genéticas sobre-expresando distintas construcciones UAS o UAS-ARNi con la línea *en-Gal4*. En primer lugar, realizamos combinaciones genéticas en las que se disminuyó la expresión de *emc* y de *stg* (Figura R4). Cuando se redujo la expresión de *emc* (*en-Gal4; UAS-emc^{ARNi}*), observamos un descenso en el área del compartimento posterior de un 20% respecto de las alas control, así como la fusión parcial de las venas 4 y 5 (Figura R4 B y E). Al reducir la expresión de *stg* (*en-Gal4/ UAS-stg^{ARNi}*) encontramos un descenso en el área del compartimento P de un 30% respecto de las alas control (Figura R4 C y E). Cuando combinamos la expresión de ambas líneas ARNi (*en-Gal4/ UAS-stg^{ARNi}; UAS-emc^{ARNi}*) observamos que la reducción en el tamaño del área era un 50% respecto al control, mayor que la observada al expresar las líneas ARNi por separado (Figura R4 D y E). Para saber si este efecto se debía a cambios en el tamaño de las células o en el número de éstas, cuantificamos ambos parámetros en los genotipos antes mencionados. Las alas que expresaban el ARNi para *emc* (*en-Gal4; UAS-emc^{ARNi}*) no presentaron ninguna alteración en el tamaño de las células (Figura R4 G y K). Sin embargo, las alas que expresaban el ARNi para *stg* (*en-Gal4/ UAS-stg^{ARNi}*) mostraron un incremento de un 150% en el tamaño celular respecto a las alas control (Figura R4 H y K). Este fenotipo se debe a que la parada de las células en la fase G2 del ciclo celular da lugar a un aumento de su tamaño (Neufeld *et al.*, 1998a). También observamos que algunas células presentaban dos tricomas en lugar de uno (Figura R4 H, flecha roja). La sobre-expresión de ambos ARNi (*en-Gal4/ UAS-stg^{ARNi}; UAS-emc^{ARNi}*) dio lugar a un incremento significativo en el tamaño celular, respecto al observado al reducir únicamente *stg* (Figura R4 I y K). Además, se produjo un notable incremento del número de células que presentaban 2 tricomas (Figura R4 I, comparar con H, flechas rojas). Estimamos el número de células presentes en el compartimento posterior y encontramos que las alas que expresaban ambos ARNi (*en-Gal4/ UAS-stg^{ARNi}; UAS-emc^{ARNi}*) (Figura R4 I) tenían un número de células significativamente menor al observado cuando se expresaron ambas líneas por separado, como se puede observar en el gráfico (Figura R4 J).

Estos resultados sugieren que los defectos de proliferación celular observados al reducir la función de *emc* podrían deberse a una insuficiencia de *stg*. En este caso esperaríamos que la sobreexpresión de *stg* rescatara la falta de proliferación causada por la falta de función de *emc*. Para

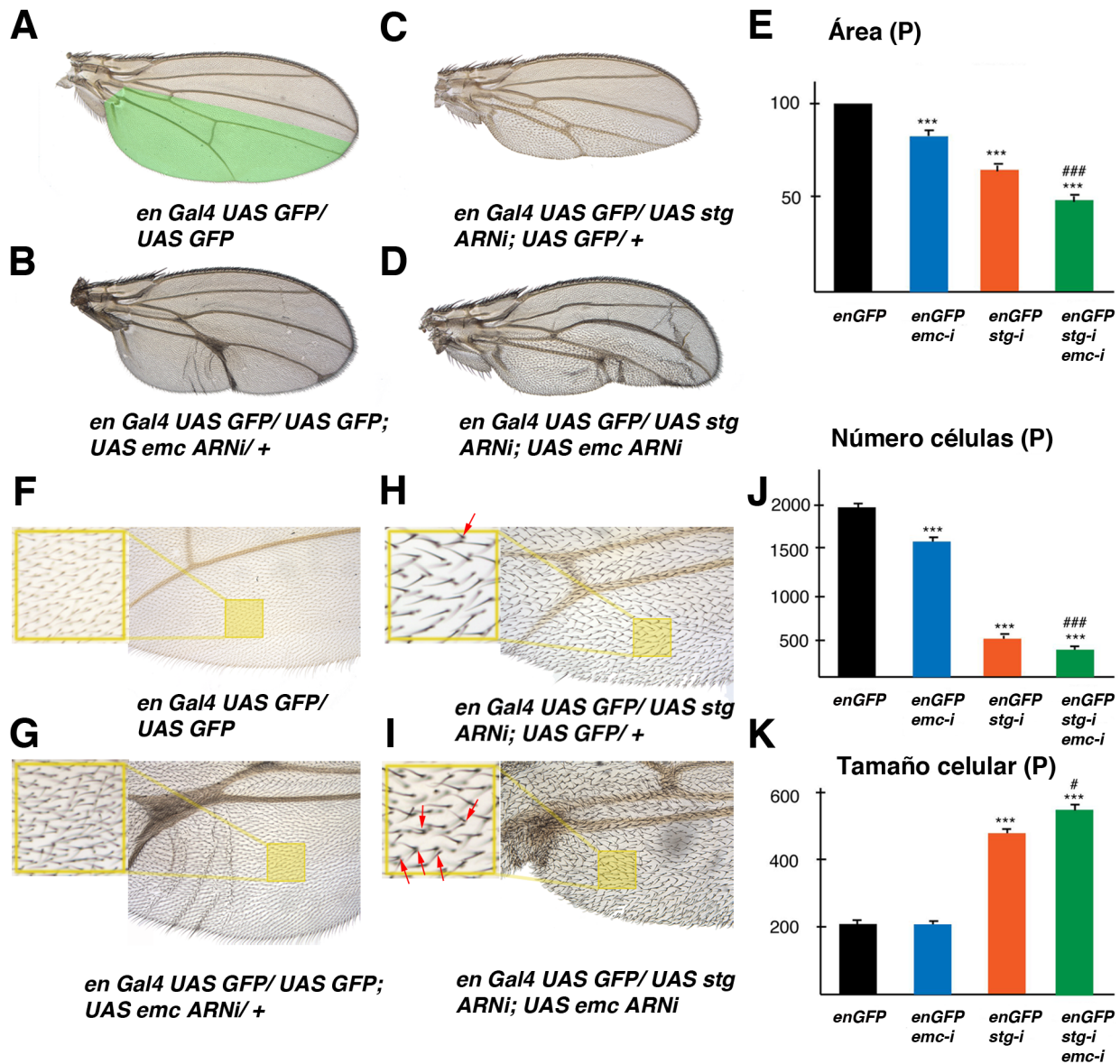


Figura R4: Fenotipos causados por la disminución de la expresión de *emc* y *string*. (A-D) Imágenes (5x) de alas adultas de genotipos: control *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP* (A), *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP; UAS-emc^{ARNi}/ +* (B), *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-stg^{ARNi}; UAS-GFP/ +* (C) y *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-stg^{ARNi}; UAS-emc^{ARNi}/ +* (D). El compartimento posterior se ha marcado en el control con un sombreado verde. (E) Representación del área medida en píxeles del compartimento posterior de las alas de genotipo mencionado en A-D. Las medidas se han expresado en % respecto al control. ***p-valor<0,001 respecto al control, ###p-valor<0,001 respecto a *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP; UAS-emc^{ARNi}/ +* y a *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-stg^{ARNi}; UAS-GFP/ +*. (F-I) Imágenes ampliadas (20x) de alas de los genotipos expuestos en A-D. El cuadro amarillo representa la región seleccionada del compartimento posterior para calcular el número de células y el tamaño celular. Las flechas rojas en H e I señalan células con dos tricomas. (J) Estimación del número de células presentes en el compartimento posterior, para cada genotipo estudiado. ***p-valor<0,001 respecto al control, ###p-valor<0,001 respecto a *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP; UAS-emc^{ARNi}/ +* y a *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-stg^{ARNi}; UAS-GFP/ +*. (K) Estimación del tamaño de las células del compartimento posterior, para cada genotipo estudiado. ***p-valor<0,001 respecto al control, #p-valor<0,05 respecto a *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-stg^{ARNi}; UAS-GFP/ +*.

comprobar esta hipótesis, sobre-expresamos *stg* en alas que expresaban el ARNi de *emc* (Figura R5). La sobre-expresión de *stg* en moscas *en-Gal4/ UAS-stg* mostró una reducción del área del compartimento posterior del ala de un 10% respecto al control (Figura R5 C, E). Cuando expresamos *UAS-stg* en combinación con *UAS-emc^{ARNi}* (*en-Gal4/ UAS-stg; UAS-emc^{ARNi}*) observamos que el fenotipo de fusión de venas que producía la falta de función de *emc* aparecía rescatado en un 100% de los individuos analizados (Figura R5 D, comparar con B). Sin embargo, al analizar el área del compartimento posterior de estos individuos, encontramos que ésta era un 20% menor que en las alas control, una reducción similar a la producida cuando la función de *emc* se eliminaba (Figura R5 E). Este resultado aparentemente paradójico podría explicarse si el tamaño de las células estuviera alterado en esta combinación mutante. La sobre-expresión de *stg* no produjo ningún cambio en el tamaño celular (Figura R5 H, K), sin embargo la combinación de *UAS-stg*; y *UAS-emc^{ARNi}* produjo un descenso en el tamaño celular de un 20% respecto al control (Figura R5 I y K, comparar con F y K). Al calcular el número de células del compartimento posterior de estas alas, observamos que era similar al de las alas control (Figura R5 J).

Estos resultados indican que un aumento de *stg* es capaz de restaurar la reducción en el número de células ocasionado por la falta de función de *emc*.

Nuestros resultados sugieren que una reducción en la expresión de *stg* podría ser responsable de los defectos de proliferación causados por la falta de *emc*. Si esto es así, un aumento de la expresión de *stg* debería rescatar todos los efectos deletéreos de la falta de *emc* sobre la proliferación y el ciclo celular. Para testar esta hipótesis, medimos el número de células en división en discos de ala de tercer estadio larvario en los que sobre-expresamos *stg* a la vez que redujimos la función de *emc* y lo comparamos con el número de células en división en discos en los que únicamente eliminamos *emc*. Los discos que expresaban el ARNi de *emc* en el compartimento posterior (*en-Gal4 UAS-GFP; UAS-emc^{ARNi}*) mostraron un descenso del número de células en división del 20% dentro del área delimitada por la expresión de Wg (Figura R6 B, D). Este descenso fue similar al observado cuando se utilizó la línea *ap-Gal4* (Figura R2 B). Cuando co-expresamos *UAS-stg* y *UAS-emc^{ARNi}* (*en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-stg; UAS-emc^{ARNi}*), encontramos que se producía un rescate del número de divisiones en el compartimento posterior, de manera que el índice mitótico de estos discos fue similar al de los discos controles (Figura R6 C, D). Además, estudiamos si la sobre-expresión de *stg* era capaz de rescatar los defectos de proliferación que presentaban los clones de células mutantes para *emc*. Para ello, analizamos el tamaño de clones mutantes para *emc* que simultáneamente sobre-expresaban *stg*, y los comparamos con clones *emc¹* y clones control. La mayoría de clones *emc¹* generados a las 60 ± 12 h TPH y analizados 60 ± 12 h después, estaban formados por menos de 10 células (54%), mientras que un 46% contenían entre 10 y 20 células. En ningún caso encontramos clones que tuvieran más de 20 células (Figura R6 F, H). Cuando sobre-expresamos *stg* en células *emc¹* encontramos que sólo un 17% de los clones tenían menos de 10 células, mientras que un 42% de los clones estaban formados por entre 10-20 células y un 41% tenían más de 20 células (Figura R6 G, H). Estos clones mostraron una distribución de tamaños similar a la encontrada en los clones control (7% <10 células, 40% entre 10-20 células y 57% > 20 células, Figura R6 E, H). Así pues, estos resultados muestran que un aumento de *stg* es capaz de rescatar los defectos de proliferación producidos por la falta de función de *emc*.

A continuación, calculamos el tiempo de duplicación celular que presentaban los clones de genotipo *UAS-stg; emc¹* (Figura R6 F) con respecto a los clones de genotipo *emc¹* (Figura R6 G). La sobre-expresión de *stg* rescató el retraso en el tiempo de duplicación celular, haciendo que las

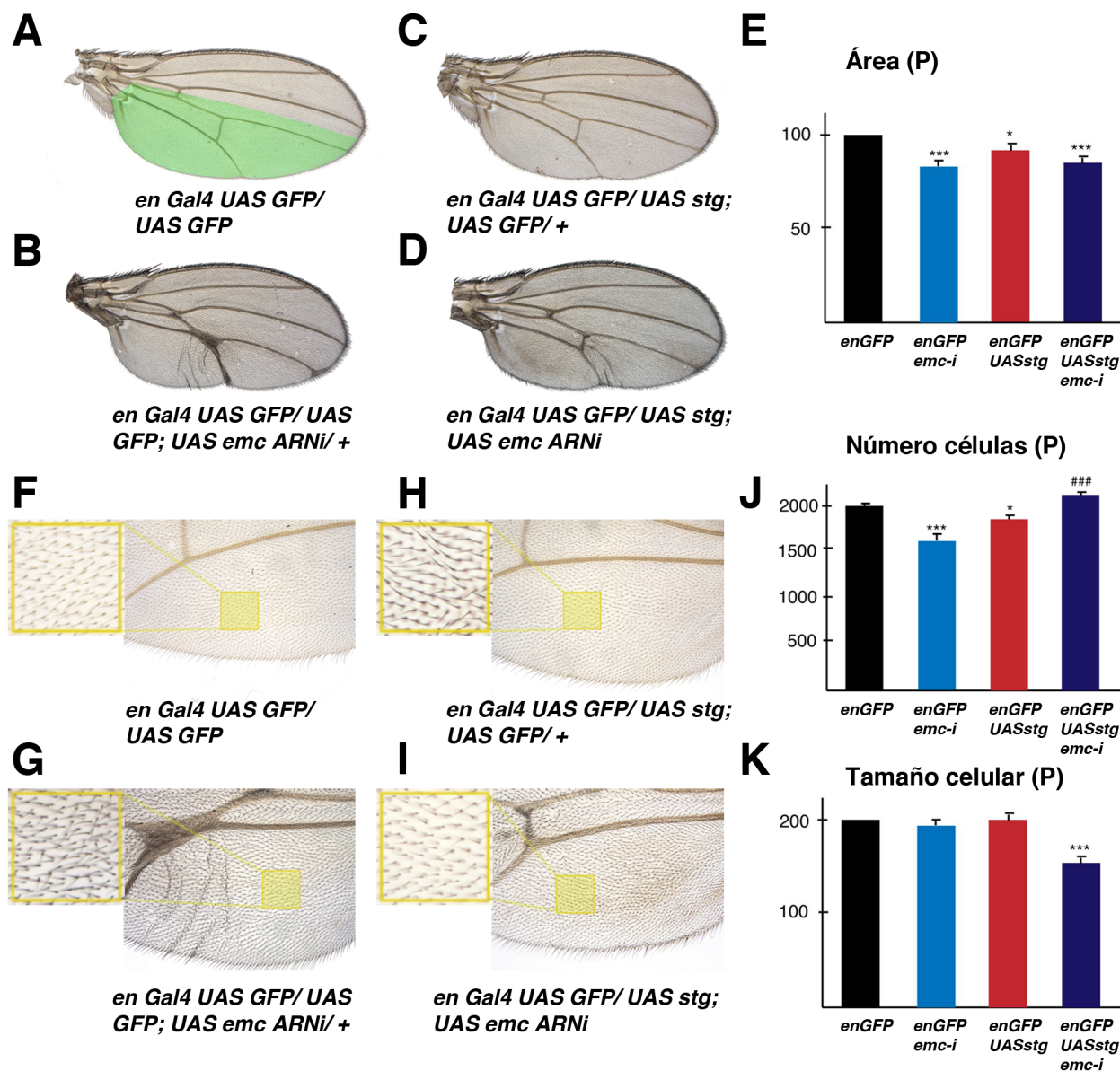


Figura R5: Fenotipos causados por la disminución de la expresión de *emc* y la sobre-expresión de *string*. (A-D) Imágenes (5x) de alas adultas de genotipos: control *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP* (A) , *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP; UAS-emc^{ARNi} / +* (B), *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-stg; UAS-GFP/ +* (C) y *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-stg; UAS-emc^{ARNi} / +* (D). El compartimento posterior del ala control se ha marcado en el control con un sombreado verde. (E) Representación gráfica del área medida en píxeles del compartimento posterior de las alas de genotipos antes mencionados. Las medidas se han expresado en % respecto al control. ***p-valor<0,001 y *p-valor<0,05 respecto al control. (F-I) Imágenes ampliadas (20x) de alas de los genotipos expuestos en A-D. El cuadro amarillo representa la región seleccionada del compartimento posterior para calcular el número de células y el tamaño celular. (J) Estimación del número de células presentes en el compartimento posterior, para cada genotipo estudiado. ***p-valor<0,001 y *p-valor<0,05 respecto al control, ###p-valor<0,001 respecto a *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP; UAS-emc^{ARNi} / +*. (K) Estimación del tamaño de las células del compartimento posterior para cada genotipo estudiado. ***p-valor<0,001 respecto al control.

células deficientes para *emc* se dividieran a un ritmo normal (13,88 h en clones de genotipo *UAS-stg*; *emc*¹ frente a 13,08 h en clones control).

Todos estos resultados indican que *emc* podría controlar la progresión del ciclo celular influyendo directamente en la regulación de la fase G2/M, a través de la regulación de la fosfatasa Stg.

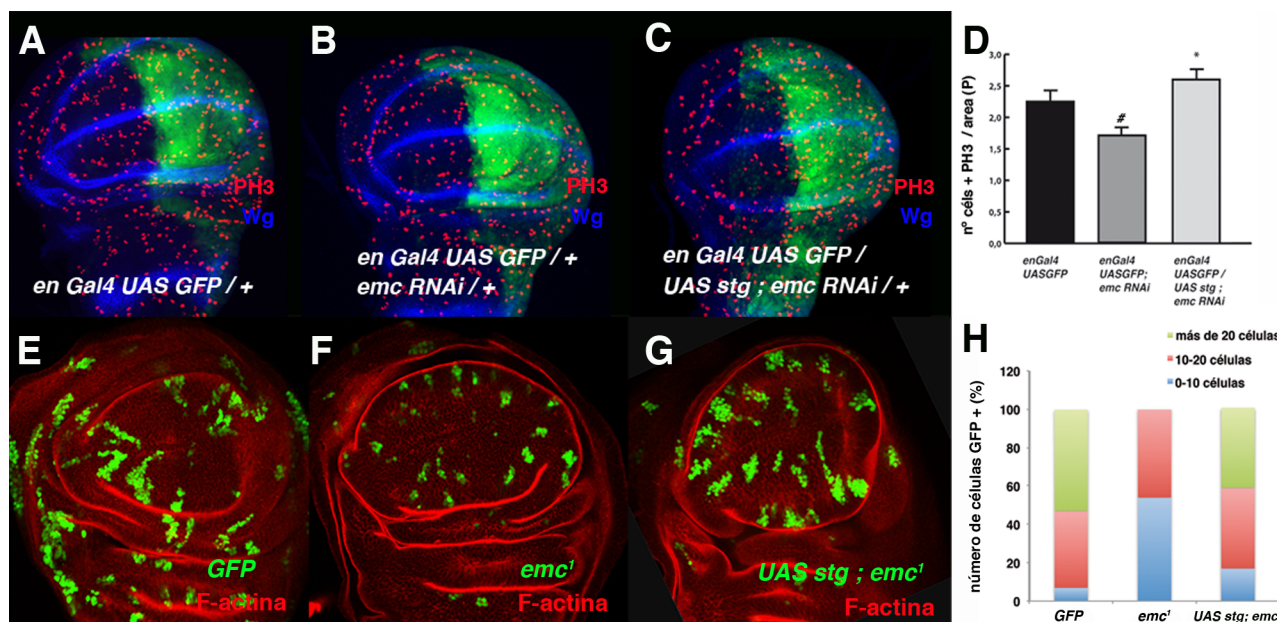


Figura R6: Cambios en el patrón de proliferación celular causados por la disminución de la expresión de *emc* y la sobre-expresión de *string*. (A-C) Expresión de PH3 (en rojo) y de Wg (en azul) en discos de tercer estadio larvario *en-Gal4 UAS-GFP / +* (A), *en-Gal4 UAS-GFP / +; UAS-emc^{ARNi} / +* (B) y *en-Gal4 UAS-GFP / UAS-stg; UAS-emc^{ARNi} / +* (C). (D) Cuantificación del índice mitótico de los discos mostrados en A-C, calculado como el número de células que expresan PH3 dividido por el área del compartimento posterior, delimitado por la expresión de Wg. La disminución de la expresión de *emc* causó una reducción del número de células en mitosis, que se recuperó hasta valores control cuando se sobre-expresó *stg* (n=10 discos por genotipo, #p-valor<0,05 respecto al control, *p-valor<0,05 respecto a *en-Gal4 UAS-GFP / +; UAS-emc^{ARNi} / +*). (E-G) Clones control (E), *emc*¹ (F) y *UAS-stg; emc*¹ (G) marcados por la expresión de GFP (en verde) en discos de ala de tercer estadio larvario. Los discos se tiñeron además con Faloidina (rojo), que delimita los contornos celulares. (H) Representación gráfica del tamaño de los clones de los genotipos citados en E-G, distribuidos según su número de células. La sobre-expresión de *stg* corrigió los defectos de crecimiento de los clones de falta de función *emc*.

1.2. Descripción de los fenotipos de ganancia de función de *emc* durante el desarrollo del ala y el notum

Para completar el análisis realizado con la falta de función de *emc* estudiamos los efectos producidos por su sobre-expresión, utilizando una línea *UAS-emc*. La expresión de este transgén en el compartimento dorsal del ala utilizando la línea *ap-Gal4* produjo distintos efectos. En el notum observamos la desaparición de macroquetas y microquetas, un fenotipo congruente con la función descrita para *emc* como inhibidor de la diferenciación neuronal (Ellis *et al.*, 1990; Cubas y Modolell,

1992; Cubas *et al.*, 1994) (Figura R7 D, comparar con C). En el ala en cambio, la sobre-expresión de *emc* produjo un fenotipo sutil de disminución de su área de un 10% respecto a las alas control *ap-Gal4*. Además, observamos la aparición ocasional de extravenas en el compartimento posterior (Figura R7 B, comparar con A). Estos resultados son distintos a los esperados, considerando que la falta de función de *emc* da lugar a una reducción del tamaño del ala, y la aparición de extra-venas (Figura R1 H).

1.3. Estudio de los efectos de la mutación de regiones conservadas de la proteína Emc sobre su fenotipo de ganancia de función en el ala y el notum

Para entender mejor cómo funciona Emc y qué dominios de esta proteína son importantes para su función, generamos formas truncadas de Emc eliminando distintas regiones de su secuencia y analizamos los efectos producidos cuando eran sobre-expresadas. En primer lugar, realizamos un estudio comparativo entre Emc y las cuatro proteínas que componen la familia Id en vertebrados (ortólogos humanos de *emc*). Emc es una proteína pequeña que contiene 199 aminoácidos, siendo de mayor tamaño que las proteínas Id (Id1: 154 aa; Id2: 134 aa; Id3: 119 aa; Id4: 161 aa). Cuando alineamos las secuencias proteicas de Emc y de cada uno de los Id utilizando la herramienta BLAST (NCBI), encontramos que la proteína Id2 era la isoforma más similar a Emc, si bien los porcentajes de homología encontrados entre cada uno de los Id y Emc fueron altos (Id1-Emc: 48%; Id2-Emc: 62%; Id3-Emc: 44%; Id4-Emc 55%). Seleccionamos tres regiones que podrían ser importantes para la función de Emc, debido a su alta homología con las isoformas de los Id o a que presentaron características moleculares interesantes. Si alguno de estos sitios fuese decisivo para que Emc ejerciese su función, su mutación produciría la eliminación de los fenotipos de sobre-expresión de *emc* antes descritos. Seleccionamos por una parte el dominio LK, situado en posición 46-47 de la secuencia proteica de Emc, que está presente en todas las isoformas de los Id en el interior de su región HLH (Figura R7 E). Además, escogimos la región consenso XXLE (que denominamos TELE), que se encuentra en posición 77-80 de Emc, y que junto con la región situada en posición 105-106 (que denominamos DS), se han definido como sitios consenso para la fosforilación por la Caseína Quinasa (CK1). Esta proteína tiene un papel importante durante la progresión del ciclo celular (Homma y Homma, 2008; St-Denis y Litchfield, 2009). Generamos por lo tanto tres líneas transgénicas que contenían la secuencia proteica de Emc completa, pero que carecían de los dominios LK, TELE o DS. Por último, también eliminamos la región poli Q que se encuentra en el extremo C-terminal de Emc (esta región no está presente en los Id). Para ello introdujimos un codón de parada de la transcripción en la posición 150-154 (a esta forma truncada la denominamos STOP).

Estas líneas transgénicas incluidas en el vector pUAS, se sobre-expresaron con la línea *ap-Gal4*. En ningún caso observamos diferencias significativas entre los fenotipos de ganancia de función de las formas truncadas de Emc respecto al observado al sobre-expresar la forma silvestre (Figura R7 G-J, comparar con D, y datos no mostrados). Este resultado indica que las regiones seleccionadas no son fundamentales para la correcta función de Emc en el ala y el notum de *Drosophila*. Sin embargo,

1.4. Descripción de los fenotipos de ganancia de función de las proteínas Id durante el desarrollo del ala y el notum

Para estudiar si los ortólogos humanos de *emc* podían reproducir los efectos causados por la sobre-expresión de *emc*, generamos distintas líneas transgénicas para tres de las cuatro isoformas de los Id (1-3). Cada una de estas líneas fue sobre-expresada en el compartimento dorsal del disco de ala bajo el control de *ap-Gal4*. La sobre-expresión de estas isoformas no produjo ningún fenotipo apreciable en el ala (datos no mostrados). Sin embargo, en el notum causó la eliminación de macroquetas, de una manera similar a la observada con la sobre-expresión de *emc*, aunque más débil. En la figura únicamente se muestra el fenotipo de sobre-expresión de Id2, ya que la sobre-expresión de las isoformas 3 y 4 fue muy similar a ésta (Figura R7 F, comparar con D). Este resultado sugiere que los factores Id pueden, al menos en parte, reproducir las funciones de *emc* en *Drosophila*, lo cual abre la posibilidad de estudiar si la alteración de algunas de las rutas de señalización que afectan a la actividad de Emc podrían también estar modulando la función de las proteínas Id humanas.

2. Análisis de la relación funcional entre *emc* y la proteína bHLH Daughterless durante el desarrollo del disco de ala

A diferencia del resto de miembros de la familia de las bHLH, Emc se caracteriza porque no posee el dominio básico de unión al ADN. Considerando la naturaleza molecular de esta proteína, así como distintos resultados genéticos, se ha propuesto que Emc forma heterodímeros con otros miembros de la familia bHLH a los que secuestra, impidiendo su unión al ADN. De esta manera, Emc funcionaría como un represor post-transcripcional. Uno de los factores bHLH con los que se ha descrito que Emc interacciona físicamente es la bHLH de clase I Daughterless (Da) (Alifragis *et al.*, 1997). Emc, a través de su interacción con Da, juega un importante papel en la especificación de las células precursoras de los órganos sensoriales de *Drosophila* (Van Doren *et al.*, 1991; Ellis *et al.*, 1990). Recientemente, Bhattacharya y Baker (2012) han establecido un modelo de regulación entre Da y Emc según el cual Da activaría su propia transcripción y la de su represor *emc*, de manera que la reducción de la expresión de *emc* daría lugar a un incremento tanto de la actividad como de la cantidad de Da. Estos autores sugieren que todos los fenotipos causados por la falta de función de *emc*, incluidos los defectos en proliferación, se deberían a la sobre-activación de Da que ocurriría en condiciones de falta de función de *emc*. Hemos verificado que la falta de crecimiento de las células mutantes para *emc* se debe al incremento de expresión de *da* que ocasiona la insuficiencia de *emc*. Para ello, realizamos clones con el alelo nulo *emc^{AP6}* en los que simultáneamente eliminamos el gen *da*, mediante la utilización del alelo nulo *da³*. Los clones se realizaron a las 60 ± 12 h TPH, y se analizaron 60 ± 12 h después. Como describimos previamente, la mayoría de los clones mutantes para el alelo *emc^{AP6}* no sobreviven (Figura R8 B). Sólo en algunas ocasiones aparecían clones pequeños, con morfología redondeada (ver Figura R1). Al eliminar *da* a la vez que *emc* (*da³; emc^{AP6}*) observamos

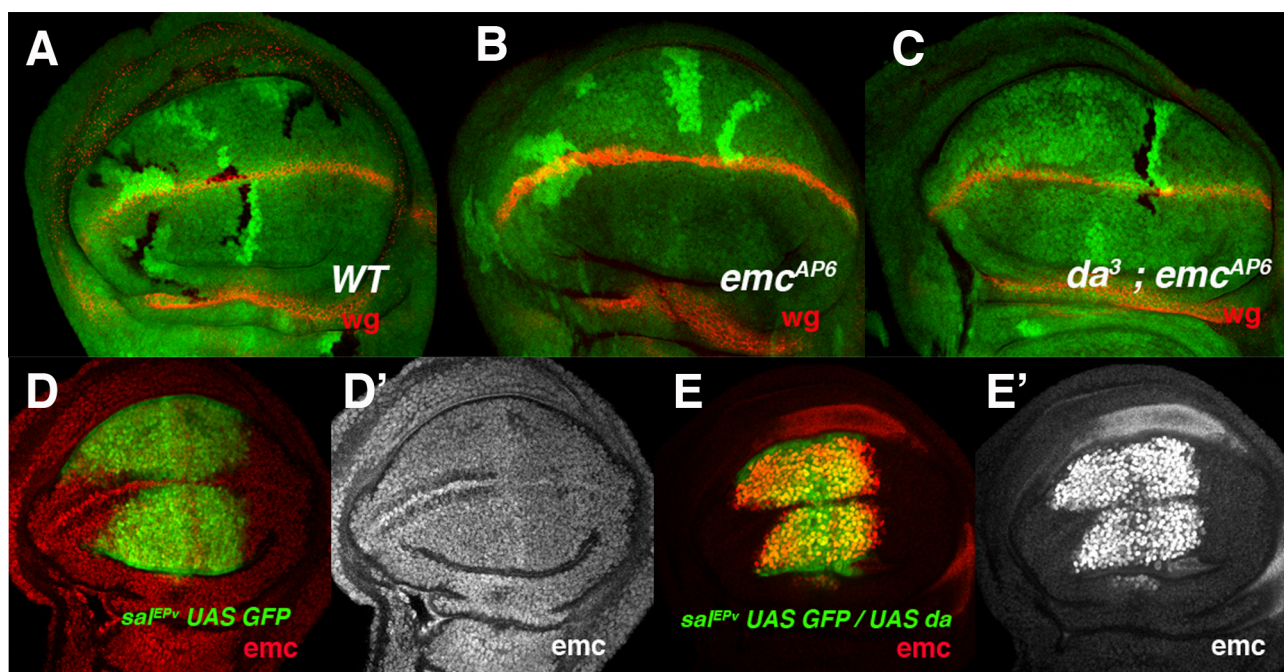


Figura R8: Bucle de regulación entre *emc* y *da*. (A-C) Imágenes representativas de clones control (A), *emc*^{AP6} (B) y *da*³; *emc*^{AP6} (C) marcados por la ausencia de GFP en discos de ala de tercer estadio larvario. Los clones hermanos aparecen marcados con doble expresión de GFP. Mientras que los clones mutantes para *emc* (*emc*^{AP6}) no crecieron, observándose sólo los clones hermanos (B), los clones dobles mutantes para *da* y *emc* (*da*³; *emc*^{AP6}) crecieron de forma similar a sus clones hermanos (C) y a los clones control (A). Los discos muestran además la expresión de Wg (en rojo). (D, E) Expresión de Ecm (en rojo en D y E y en gris en D' y E') en discos de ala de genotipo *sal*^{EPv}-*Gal4* UAS-GFP/+ (D, D') y *sal*^{EPv}-*Gal4* UAS-GFP/ UAS-*da* (E, E'). En condiciones de sobre-expresión de *da*, se produjo un fuerte aumento de la expresión de Ecm (comparar E' con D').

que se recuperaba la viabilidad, de manera que el tamaño de estos clones dobles mutantes se asemejaba al de sus clones gemelos (Figura R8 C).

De acuerdo al modelo propuesto por Bhattacharya y Baker (2012), esperaríamos que un aumento de *da* en el disco de ala causara un incremento de *emc*, como se ha descrito que sucede en el disco de ojo. Para comprobarlo sobre-expresamos UAS-*da* en la región central del disco de ala utilizando la línea *sal*^{EPv}-*Gal4* y analizamos la expresión de Ecm mediante una tinción inmunohistoquímica. Los discos control de genotipo *sal*^{EPv}-*Gal4* UAS-GFP mostraron una tinción para Ecm nuclear homogénea, con niveles mayores de expresión en el borde D/V y en una banda de células adyacentes al borde A/P (Figura R8 D-D'). Sin embargo, los discos que sobre-expresaban UAS-*da* (*sal*^{EPv}-*Gal4* UAS-GFP/ UAS-*da*) mostraron unos niveles muy elevados de expresión de Ecm en la región *sal*^{EPv} (Figura R8 E -E').

Estos resultados indican que, al igual que había sido propuesto en el disco de ojo (Bhattacharya y Baker, 2012), *da* regula la expresión de *emc* durante el desarrollo de los discos de ala, y que los defectos de proliferación mostrados por la células mutantes para *emc* son consecuencia de la sobre-expresión de Da que se produce al eliminar la función de *emc*.

3. Estudio de los requerimientos del gen *daughterless* durante el desarrollo del ala y el notum de *Drosophila melanogaster*

3.1. Descripción de los fenotipos de falta de función de *daughterless* durante el desarrollo del ala de *Drosophila*

La función del gen *da* durante el desarrollo del notum de *Drosophila* ha sido ampliamente estudiada. Se ha propuesto que este gen juega un papel muy importante en promover la determinación de los órganos sensoriales, de modo que su eliminación causa la ausencia de los mismos (Caudy *et al.*, 1988). Para conocer mejor el posible papel de este gen sobre el crecimiento del disco de ala, expresamos un ARNi para *da* bajo el control de la línea *ap-Gal4*. La sobre-expresión de este ARNi produjo una fuerte reducción de la expresión de *da*, como se puede observar en los discos *ap-Gal4; UAS-da^{ARNi}* marcados con anti-Da (Figura R9 B). Las alas adultas del mismo genotipo fueron un 12% más grandes que las alas control, lo cual indica que *da* podría tener un papel en el control de la proliferación (Figura R9 D, comparar con C). En el notum de estas moscas puede observarse una reducción en el número de quetas (datos no mostrados) que valida la utilización de esta línea ARNi, ya que reproduce el fenotipo ocasionado por alelos de falta de función de *da*.

Para saber si el aumento en el tamaño del ala adulta se debía a un aumento de la división celular durante la fase de crecimiento larvario, analizamos la expresión de PH3 en discos de tercer estadio larvario de genotipo *ap-Gal4; UAS-da^{ARNi}*. No observamos diferencias significativas en el número de células en división en el compartimento dorsal entre discos mutantes y control (datos no mostrados). Así pues, decidimos estudiar si el aumento de tamaño observado en el ala adulta se debía a un incremento de la proliferación durante la fase de pupa. Para analizar esta posibilidad, realizamos clones de falta de función de *da* utilizando el alelo nulo *da¹⁰*. Las pupas se analizaron a las 4, 8 y 24 h tras la formación del pupario y se tiñeron con PH3. Los clones mutantes para *da* restringían su crecimiento a la región de intervena, hecho visible desde el comienzo de la pupación. No observamos un incremento destacable en el número de células en proliferación en los clones mutantes para *da* con respecto a los clones controles (Figura R9 E-G). Por lo tanto, no hemos podido establecer las causas por las que una insuficiencia de *da* ocasiona alas de un tamaño mayor a las controles. Sería necesario realizar otros análisis para poder establecer con claridad a qué se debe el incremento de tamaño de las alas adultas mutantes para *da*.

3.2. Descripción de los fenotipos de ganancia de función de *daughterless* durante el desarrollo del ala de *Drosophila*

Para estudiar el efecto sobre el desarrollo del ala causado por el aumento de expresión de *da*, sobre-expresamos este gen bajo el control de la línea *sal^{EPV}-Gal4*. Las alas adultas de genotipo *sal^{EPV}-Gal4/ UAS-da* fueron notablemente más pequeñas que las alas control y mostraron la fusión de las venas 2-3 y 4-5, permaneciendo una parte de la región de intervena 3-4. Además, observamos la aparición de numerosas quetas sobre las venas fusionadas (Figura R10 B, comparar con A). La sobre-

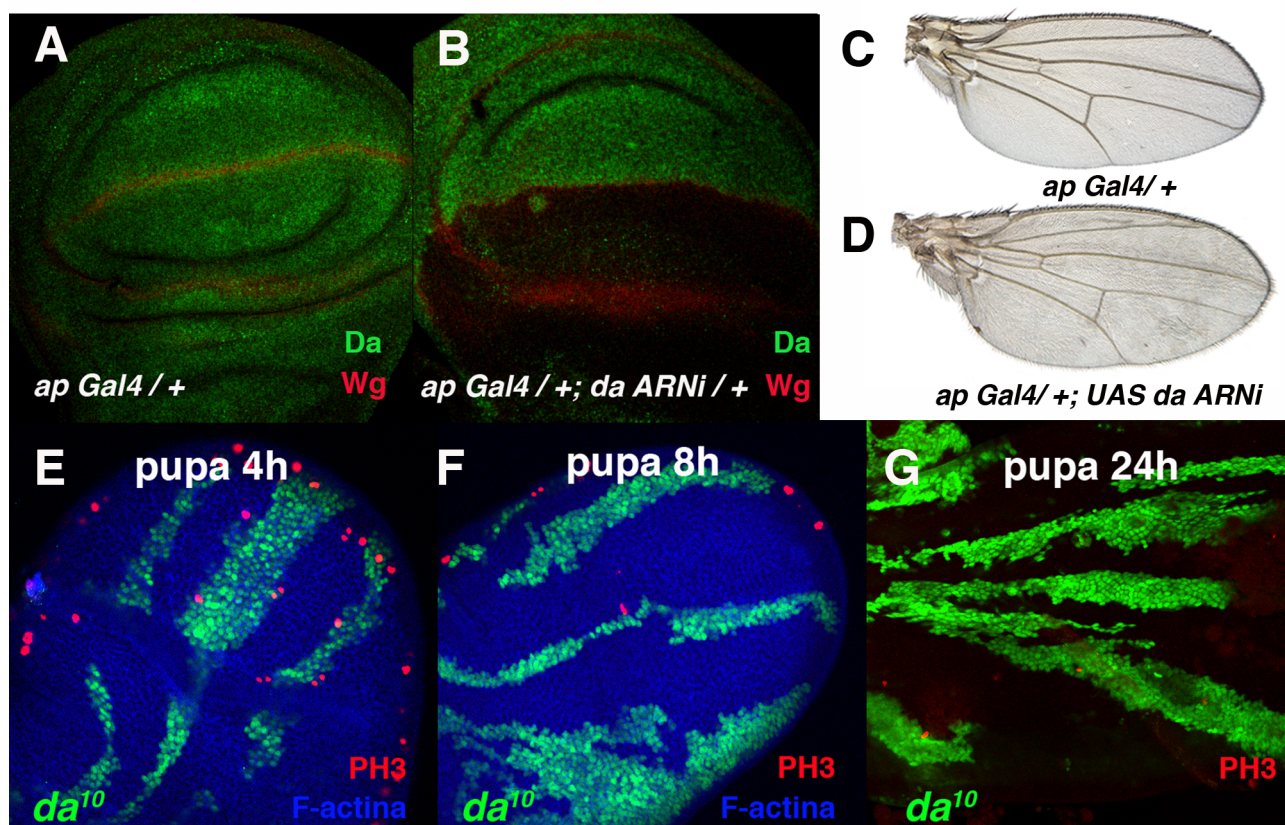


Figura R9: Fenotipos causados por la falta de función de *da* durante el desarrollo del ala. (A, B) Discos de ala de tercer estadio larvario de genotipo *ap-Gal4 UAS-GFP/+* (A) y *ap-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-da^{ARNi}/+* (B). Los discos muestran la expresión de Wg (en rojo) y Da (en verde). La sobre-expresión del ARNi de *da* causó una fuerte reducción de la expresión de Da en el compartimento dorsal (comparar B con A). (C, D) Alas adultas de los genotipos descritos en A y B. La disminución de la expresión de *da* causó un aumento del tamaño del ala de un 10% (comparar D con C). (E-G) Clones de falta de función de *da* (*da¹⁰*), observados durante el desarrollo pupal a las 4 h (E), 8 h (F) y 24 h (G) tras la formación del pupario. La expresión de PH3 se observa en rojo (E-G) y la de F-actina en azul (E, F). La falta de función de *da* no causó un aumento del número de células en división durante la fase pupal.

expresión de *da* con otras líneas como *en-Gal4* o *ap-Gal4* resultó ser letal, incluso en condiciones en las que la expresión de *da* se inducía al final del tercer estadio larvario, utilizando el sistema Gal4/Gal80^{ts}.

Por otro lado, generamos clones de células que sobre-expresan *da* a las 60 ± 12 h TPH y los analizamos 60 ± 12 h después, en discos de ala de tercer estadio larvario. Teñimos los discos con anti-Wg, para distinguir las distintas regiones del disco de ala. Estos clones, marcados por la presencia de GFP, mostraron una reducción de tamaño muy marcada con respecto a los clones control, más patente en la región presuntiva de ala que fuera de ella (Figura R10 H, comparar con G).

Estos resultados sugieren que *da* es necesario para el control de la proliferación durante el desarrollo del ala de *Drosophila*.

3.2.1. Estudio de los efectos causados por ganancia de función de *daughterless* sobre la proliferación y la progresión del ciclo celular

Para dilucidar las causas del fenotipo de reducción del tamaño del ala producido por el incremento de *da*, en primer lugar analizamos el patrón de proliferación de discos en los que sobre-expresamos *UAS-da*, para lo que calculamos su índice mitótico. La sobre-expresión de *da* con la línea *sal^{EPV}-Gal4 (sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da)* causó una reducción del tamaño de la región de expresión *sal^{EPV}* durante el desarrollo larvario, lo que concuerda con los fenotipos observados en las alas adultas (Figura R10 E, comparar con D). Cuando comparamos el índice mitótico entre los discos que sobre-expresaban *UAS-da* y los discos controles, observamos una reducción del número de células en división de un 60% en los discos mutantes (índice mitótico $1,08 \pm 0,09$ en *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da* frente a $3,13 \pm 0,18$ en controles *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP*, $n > 20$, $p\text{-valor} < 0,001$, Figura R10 E, D).

Previamente habíamos demostrado que una reducción de la expresión de *emc* causaba un aumento del número de células retenidas en la fase G2 del ciclo celular (ver apartado 1.1.2). Considerando que los fenotipos de falta de proliferación en células mutantes para *emc* pueden ser suprimidos cuando *da* es eliminado, y que la sobre-expresión de *da* reduce la proliferación, un posible mecanismo acerca de cómo *emc* podría controlar la división celular es que lo hiciera a través de *da*. Si esto es así, esperaríamos que la sobre-expresión de *da* reprodujera los efectos en el ciclo celular observados cuando *emc* es eliminado. Decidimos analizar el perfil del ciclo celular en discos de ala de larvas *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da* utilizando la técnica de FACS. Encontramos que un alto porcentaje de las células con altos niveles de *da* (células GFP +) estaban retenidas en la fase G2 del ciclo celular. Así, mientras que el 40% de las células GFP + de los discos controles estaban en fase G2 del ciclo, cuando sobre-expresamos *UAS-da* este porcentaje aumentó hasta el 63% (Figura R10 J). Las células GFP – de ambos tipos de discos mostraron un perfil del ciclo celular similar al mostrado para las células GFP + de discos control (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares cuando se indujo la sobre-expresión de *da* con la línea *en-Gal4 UAS-GFP; tubGal80^{ts}*. Para este experimento, se indujo la expresión de *da* durante 48h, comenzando a las 132 ± 12 h TPH. Los cambios obtenidos sobre el perfil del ciclo celular en condiciones de sobre-expresión de *da* fueron muy similares a los observados en condiciones de falta de *emc* (ver Figura R2 D).

De este modo, concluimos que la parada en la fase G2 del ciclo observada en condiciones de falta de *emc* podría deberse a la sobre-expresión de *da* que se produce en estas células mutantes.

3.2.2. Papel de la muerte celular en los fenotipos de ganancia de función de *daughterless*

Los fenotipos de reducción del tamaño de las alas adultas ocasionados por la sobre-expresión de *da*, así como los defectos de crecimiento de los clones de células que sobre-expresan este gen, podrían deberse, además de a los cambios expuestos en el apartado anterior, a la existencia de un aumento de la muerte celular. Para evaluar el posible papel de la apoptosis en los efectos producidos

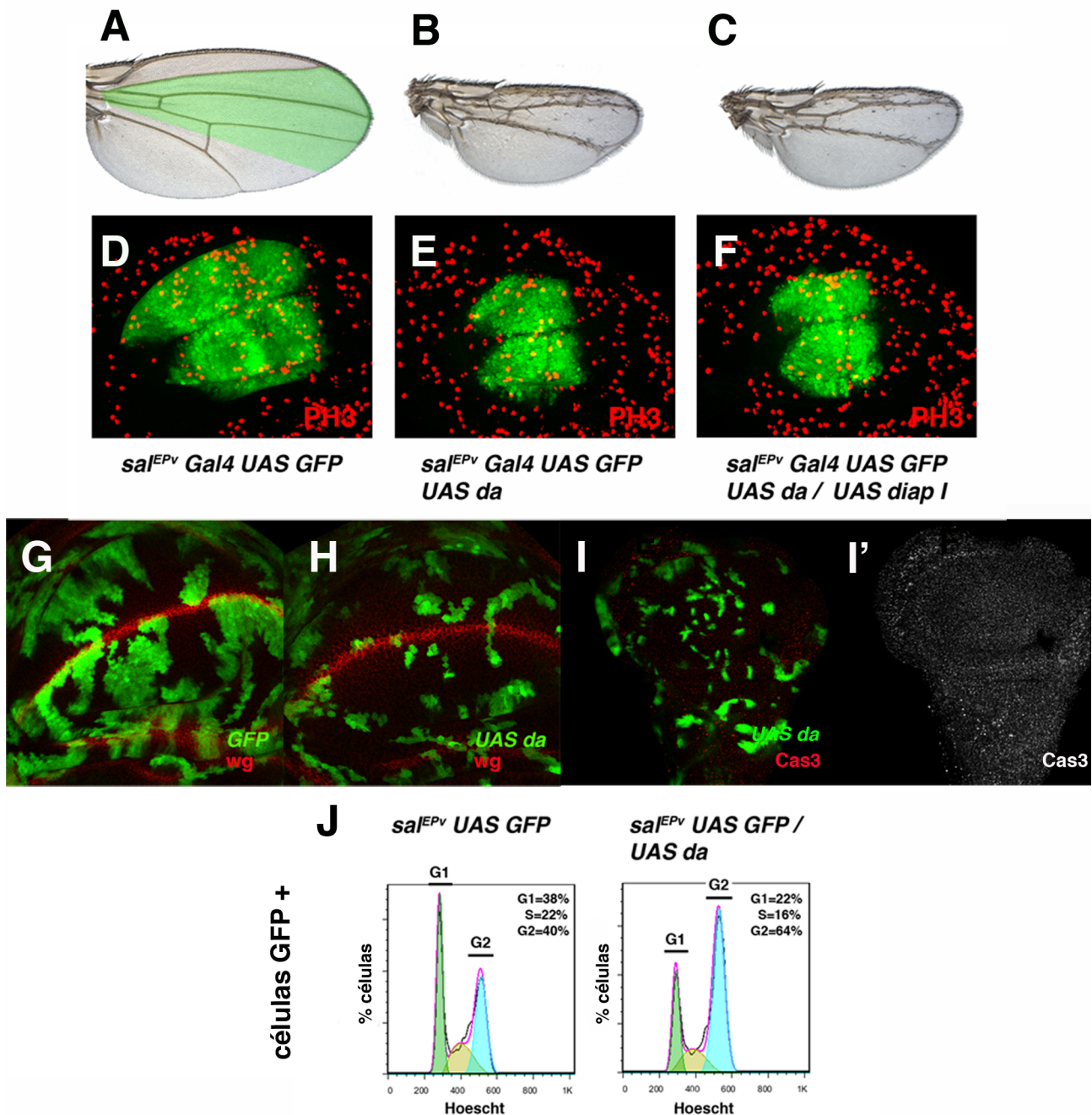


Figura R10: Fenotipos causados por la sobre-expresión de *da* durante el desarrollo del ala. (A, C) Alas adultas de genotipo *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/+* (A), *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/UAS-da* (B) y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP UAS-da/ UAS-diap I* (C). La sobre-expresión de *da* en el territorio *sal^{EPV}* (marcado por un sombreado verde en A) causó una fuerte reducción del tamaño del ala y la aparición de quetas sobre las venas (comparar B con A). Este fenotipo no cambió cuando se co-expresó el inhibidor de la muerte celular *diap I* (comparar C con B). (D-F) Discos de ala de tercer estadio larvario de los genotipos citados en A-C. Los discos muestran la expresión de PH3 (en rojo). La sobre-expresión de *da* ocasionó la reducción de la región *sal^{EPV}* (en verde), y la disminución de la expresión de PH3 (comparar E con D). Este fenotipo no cambió cuando se co-expresó *diap I* (comparar F con E). (G-H) Clones de células de genotipo control (*GFP*) y *UAS-da* marcados en verde, en discos de ala de tercer estadio larvario. Los discos muestran la expresión de *Wg* (en rojo). Los clones de sobre-expresión de *da* fueron más pequeños que los clones control. (I, I') Clones de células de genotipo *UAS-da* que muestran la expresión de Cas3 (en rojo en I y en gris en I'). No se observó activación de Caspasa 3 a causa de la sobre-expresión de *da*. (J) Perfil del ciclo celular que mostraron las células *GFP +* de genotipo *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/+* y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da*. En el gráfico se han marcado las fases G1 y G2 del ciclo, y los porcentajes medios de células que se encontraron en cada fase para ambos genotipos. La sobre-expresión de *da* causó un aumento del número de células en la fase G2 del ciclo.

por la sobre-expresión de *Da*, co-expresamos el inhibidor de la muerte celular de *Drosophila* *diap I* junto con *da*. Para ello utilizamos la línea *sal^{EPV}-Gal4*. Cuando comparamos los discos y las alas de genotipo *sal^{EPV}-Gal4 UAS-da/ UAS-diap* los de individuos *sal^{EPV}-Gal4/ UAS-da*, observamos que la sobre-expresión de *diap I* no fue suficiente para suprimir ni la reducción del tamaño del ala adulta (Figura R10 C, comparar con B), ni la reducción del índice mitótico producida por la sobre-expresión de *da* (índice mitótico en discos *sal^{EPV}-Gal4 UAS-da/ UAS-diap*: $0,98 \pm 0,21$ frente a $1 \pm 0,04$ en discos *sal^{EPV}-Gal4/ UAS-da*, Figura R10 F, comparar con E). Además, realizamos tinciones inmunohistoquímicas para detectar la presencia de Caspasa 3 activa en discos imaginales que sobre-expresaban *da*. No se detectó la presencia de esta proteína en discos con clones de sobre-expresión de *da* (Figura R10 I-I').

En conjunto, estos resultados indican que la muerte celular no parece jugar un papel importante en los fenotipos producidos por la sobre-expresión de *da*.

3.2.3. Estudio de los efectos producidos por la ganancia de función de *daughterless* sobre las proteínas reguladoras de la transición G2/M

Como se ha descrito en el apartado 1.1.3, para que se produzca la transición G2/M es fundamental que la fosfatasa *Stg* desfosforile al complejo *CycB/Cdk1*. Un incremento en la duración de la fase G2 o incluso una parada del ciclo en esta fase podría deberse a una reducción de la expresión de *CycB*, o a una disminución en la función o en la expresión de *stg*. Hemos estudiado si alguno de estos reguladores de la progresión del ciclo estaba afectado en condiciones de sobre-expresión de *da*. Para ello, realizamos en primer lugar tinciones inmunohistoquímicas para la proteína *CycB*, en discos de ala de larvas de tercer estadio que sobre-expresaban *da* en el dominio *sal^{EPV}* (Figura R11 A, B). No observamos ningún cambio en la expresión de esta proteína en discos mutantes, comparada con discos control (Figura R11 B', comparar con A').

En segundo lugar, analizamos si un descenso en la transcripción de *stg* podría ser causante de los cambios en el ciclo celular ocasionados por la sobre-expresión de *da*. Para ello, analizamos en discos en los que sobre-expresamos *UAS-da* la expresión de *stg* mediante hibridaciones *in situ* con sondas que reconocen el ARNm de *stg*. Cuando comparamos el patrón de expresión de *stg* en discos de tercer estadio de larvas *sal^{EPV}-Gal4/ UAS-da* con discos de larvas control, apreciamos una reducción de la expresión del ARNm de *stg* en el dominio de expresión *sal^{EPV}* (Figura R11 D, comparar con C). Obtuvimos resultados similares cuando sobre-expresamos *da* de forma temporal (durante 48h) con *ap-Gal4*, utilizando el sistema *Gal4/Gal80^{ts}* (datos no mostrados).

Para realizar un análisis cuantitativo de la disminución de la expresión de *stg* en las distintas condiciones mutantes utilizadas, llevamos a cabo ensayos de PCR-cuantitativa a tiempo real (qPCR). Esta técnica nos permite cuantificar la cantidad de ARNm presente en distintas condiciones experimentales. Así, se extrajo el ARN total de discos de ala de tercer estadio de larvas *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da; tubGal80^{ts}*, que se habían mantenido a temperatura restrictiva durante 48h, y larvas controles de genotipo silvestre que habían sufrido el mismo tratamiento. También analizamos discos

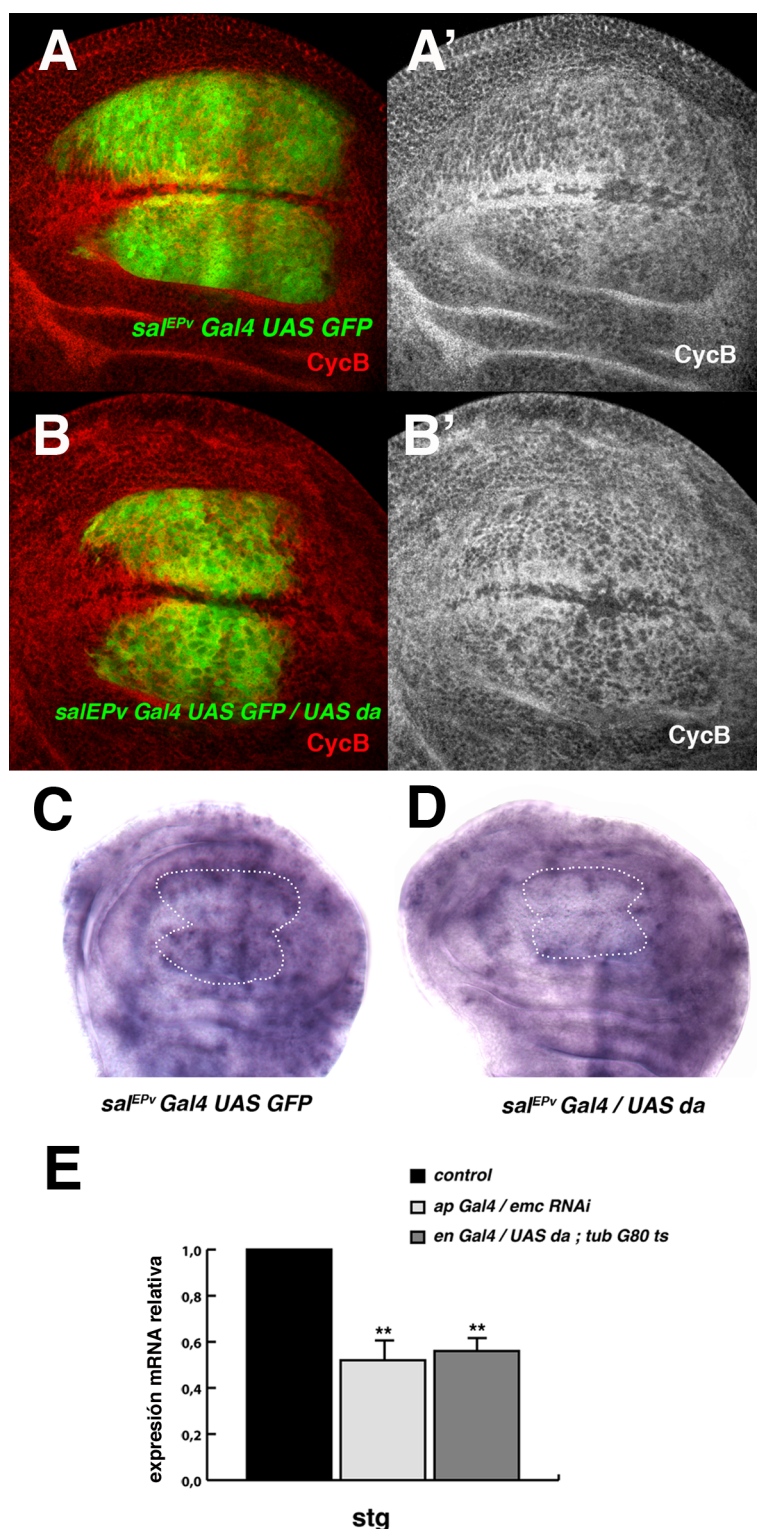


Figura R11: Expresión de las proteínas reguladoras de la transición G2/M en condiciones de sobre-expresión de *da*. (**A**, **B**) Discos de ala de tercer estadio larvario de genotipo *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ +* (**A-A'**) y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da* (**B-B'**) que muestran la expresión de CycB (en rojo en **A** y **B**, y en gris en **A'** y **B'**). La expresión de CycB no se modificó debido a la sobre-expresión de *da*. (**C**, **D**) Hibridaciones *in situ* realizadas con una sonda que reconoce el ARNm de *string*, en discos de igual genotipo que en **A** y **B**. La región presuntiva *sal^{EPV}* se ha señalado con una línea de puntos. Se observó una disminución de la expresión de *stg* en condiciones de sobre-expresión de *da*. (**E**) Representación gráfica de los niveles de ARNm de *string* medida mediante qPCR, de discos de ala de tercer estadio larvario de genotipos control, *ap-Gal4 UAS-GFP/ +*; *UAS-emc^{ARNi}/ +* y *en-Gal4/ UAS-da*; *tubGal80^{ts}/ +*. Los valores se relativizaron con respecto al control, de genotipo silvestre. La expresión de *stg* se redujo tanto al disminuir la función de *emc*, como al sobre-expresar *da* ($n=4$, ** p -valor $<0,01$ respecto al control).

de larvas *ap-Gal4; UAS-emc^{ARNi}* para evaluar si en condiciones de falta de función de *emc* se reducía la expresión de *stg*. Los resultados mostraron que, a pesar de que sólo se había sobre-expresado *da* en una región del disco, la expresión de *stg* se redujo en un 50% respecto al control. Observamos resultados muy similares en condiciones de reducción de la expresión de *emc* (Figura R11 E). Para estudiar si la disminución de la expresión de *stg* era específica y comprobar si la expresión de otros reguladores implicados en la transición G2/M estaba también alterada, analizamos la expresión del

gen *cycB*. No observamos cambios significativos en los niveles de ARNm de *cycB* en condiciones de ganancia de función de *da* ni cuando redujimos la función de *emc* (datos no mostrados).

Estos resultados muestran que la sobre-expresión de *da*, de forma directa o indirecta, produce un fuerte descenso de la expresión de *stg*, que podría ser responsable de la acumulación de células en la fase G2 del ciclo observada en estas condiciones mutantes.

3.2.4. Análisis de la relación funcional entre *daughterless* y *string*: descripción de la interacción entre ambos genes en condiciones de ganancia de función

Nuestros resultados indican que la ganancia de función de *da* ocasiona una represión de la transcripción de *stg*. Esta disminución de los niveles de *stg* podría explicar el acúmulo de células en la fase G2 del ciclo que ocurre cuando *da* es sobre-expresado, y ser la causa de los fenotipos de reducción del tamaño del ala que produce esta condición mutante. De acuerdo con esta teoría, esperaríamos que la sobre-expresión de *stg* fuera suficiente para rescatar los defectos de falta de proliferación producidos por los altos niveles de *da*. La sobre-expresión conjunta de *da* y *stg* bajo la regulación de *sal^{EPV}* (*sal^{EPV}-Gal4 UAS-da/ UAS-stg*) produjo una fuerte supresión del fenotipo de reducción del tamaño del ala producido por la sobre-expresión de *da*, (Figura R12 D comparar con C). El fenotipo de aparición de quetas que se observaba en condiciones de ganancia de función de *da* no se vio afectado por el aumento de expresión de *stg*, hecho que pone de manifiesto que las funciones de *da* sobre el control de la diferenciación son independientes de la regulación de los niveles de expresión de *stg*. Para saber si el rescate observado en el tamaño del ala adulta se debía al re-establecimiento del patrón de división durante el desarrollo larvario, analizamos el número de células en mitosis en discos de ala de los mismos genotipos que usamos para el análisis de las alas adultas. La sobre-expresión de *stg* produjo un aumento muy significativo del número de células en división en la región de expresión *sal^{EPV}* (índice mitótico: $7,04 \pm 0,17$ en *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-stg* frente a $3,01 \pm 0,04$ en el control *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP*). En los discos en los que se co-expresó *da* y *stg*, se produjo un rescate completo del número de células en división, de manera que el índice mitótico recuperó valores similares a los observados en discos silvestres ($4,43 \pm 0,17$ en los discos *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP UAS-da/ UAS-stg* frente a $1,71 \pm 0,04$ en *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da*, $n=10$, $p\text{-valor}<0,001$; Figura R12 E-H). Además, analizamos la expresión de CycB en estos discos (Figura R12 I-L). La sobre-expresión de *stg* produjo un descenso en la expresión de CycB en el dominio de expresión *sal^{EPV}* (Figura R12 J, comparar con I). Las células que sobre-expresan *stg* tienen un paso por la fase G2 muy rápido (Neufeld *et al.*, 1998a), lo que explicaría la reducción de CycB. La combinación de la sobre-expresión de *stg* y *da* dio lugar a la misma disminución de CycB observada con la ganancia de función de *stg* (Figura R12 L, comparar con J).

Nuestros resultados muestran que el defecto en la proliferación que produce la ganancia de función de *da* se debe principalmente a la disminución de la expresión de *stg*, ya que un aumento del mismo produce un rescate muy significativo de la proliferación celular.

3.2.5. Estudio de los fenotipos producidos por reducción de la expresión de *daughterless* sobre la transcripción de *string*

Nuestros datos indican que la sobre-expresión de *da* es suficiente para reprimir la expresión de *stg* (apartado 3.2.3). Por otro lado, hemos observado que al reducir la expresión de *da* el tamaño del ala aumenta (apartado 3.1). Por lo tanto es factible suponer que la eliminación de *da* podría producir una des-represión de *stg*, dando lugar a un incremento de la proliferación. Para evaluar esta posibilidad, realizamos experimentos de hibridación *in situ* en los que estudiamos la expresión de *stg* en discos de ala de tercer estadio en los que se había reducido la función de *da* en el compartimento dorsal. No encontramos diferencias significativas entre el patrón de expresión de *stg* en los discos mutantes (*ap-Gal4; UAS-da^{ARNi}*) y los discos controles (*ap-Gal4*; Figura R13 A, B). También analizamos

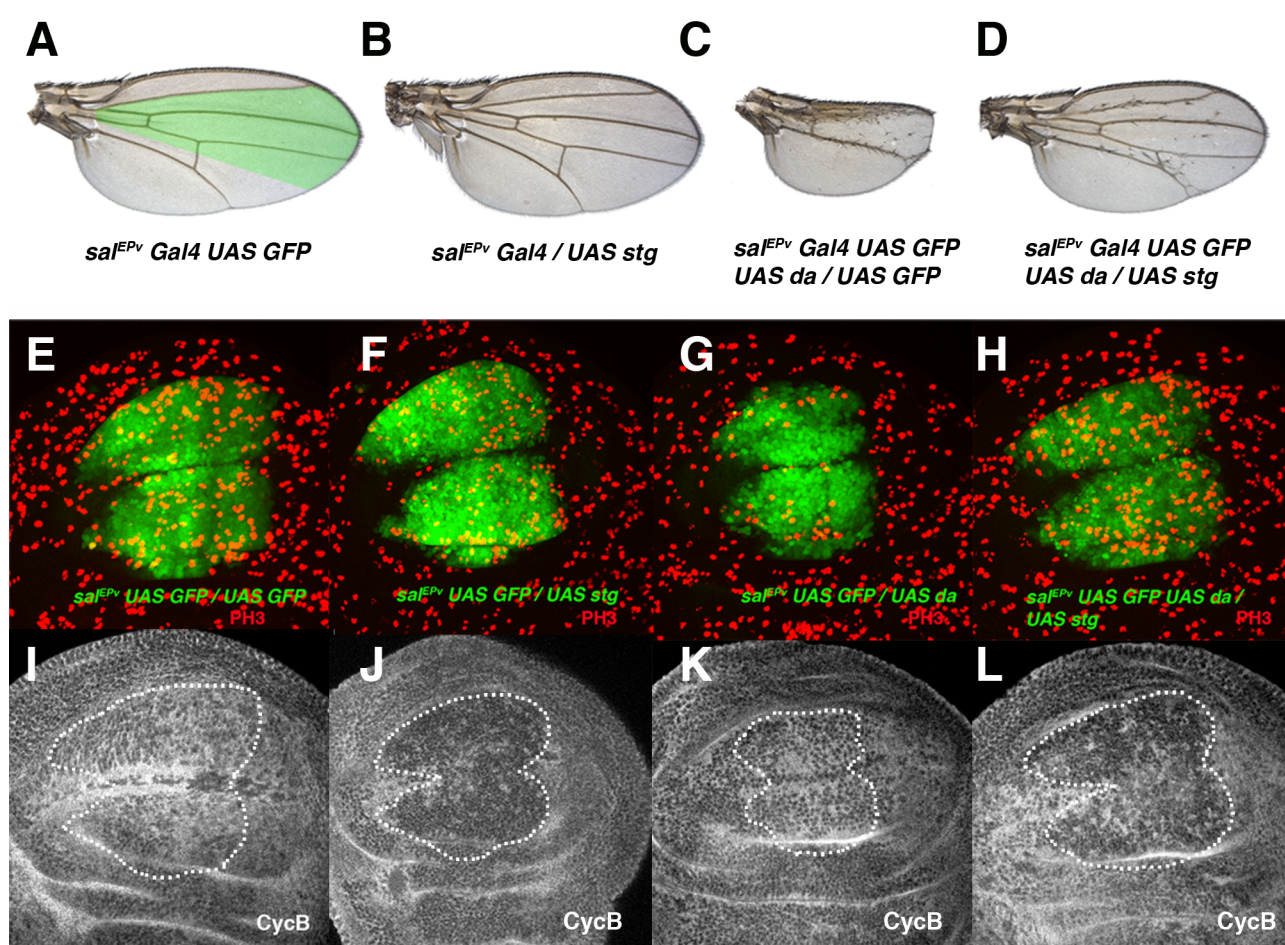


Figura R12: Efecto de la co-expresión de *da* y *stg*. (A-D) Alas adultas de genotipo control *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ +* (A), *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-stg* (B), *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP UAS-da/ UAS-GFP* (C), y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP UAS-da/ UAS-stg* (D). El dominio de expresión *sal^{EPV}* se ha marcado con un sombreado verde en el control (A). La co-expresión de *da* y *stg* produjo un rescate muy significativo del tamaño de la región *sal^{EPV}*, que se había visto disminuido al sobre-expresar *da* (comparar D con C). (E-H) Marcaje con PH3 (en rojo) en discos de ala de tercer estadio larvario de igual genotipo que en A-D. El dominio de expresión *sal^{EPV}* aparece marcado por la expresión de GFP (en verde). La co-expresión de *da* y *stg* aumentó el tamaño del dominio *sal^{EPV}*, y produjo un aumento del número de células que expresaban PH3 (comparar H con G). (I-L) Expresión de CycB (en gris) en discos de ala de los genotipos antes mencionados. La región presuntiva *sal^{EPV}* se ha señalado con una línea punteada. Tanto la sobre-expresión de *stg* (J) como la combinación de la sobre-expresión de *da* y *stg* (L) produjeron la bajada de la expresión de CycB (comparar J y L con I).

si existían diferencias en la expresión de *stg* entre ambos tipos de discos mediante experimentos de PCR cuantitativa. Tampoco en este caso observamos diferencias significativas en la expresión de *stg* (Figura R13 C). Además, el perfil del ciclo celular de los discos que expresaban el ARNi de *da* fue similar al observado en discos control (datos no mostrados), no pudiéndose apreciar ninguna alteración en las distintas fases del ciclo.

Estos resultados indican que la reducción en los niveles de Da no es suficiente para la activación de la expresión de *stg*, lo que sugiere que deben existir otros factores que son necesarios para su activación transcripcional.

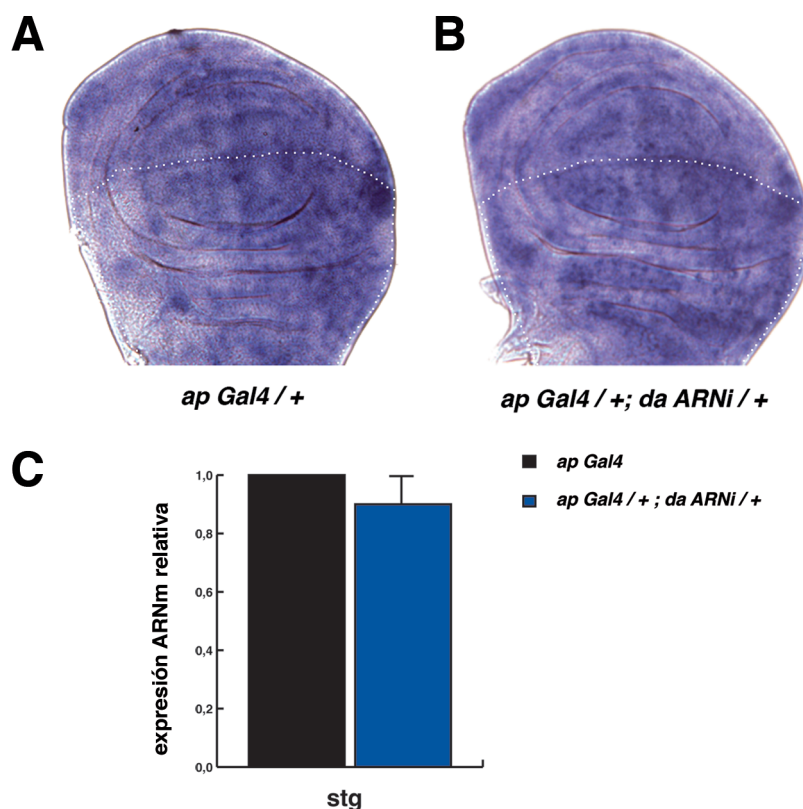


Figura R13: Efecto de la eliminación de *da* en la transcripción de *string*: (A, B) Hibridaciones *in situ* realizadas con una sonda que reconoce el ARNm de *string*, en discos de ala de tercer estadio larvario de genotipo *ap-Gal4/+* (A), y *ap-Gal4/+; UAS-da^{ARNi}/+* (B). (C) Representación gráfica que muestra la expresión del ARNm de *string*, medida mediante qPCR, de discos de igual genotipo que en A y B. Los resultados están representados con respecto al control *ap-Gal4*. En ninguno de los dos experimentos se observaron cambios en la expresión de *stg*.

4. Estudio de la función de Daughterless como represor directo de la transcripción de *string*

4.1. Análisis de la región reguladora de *string* y conservación de sitios de unión de Daughterless en esta región

Nuestros resultados sugieren que Da está reprimiendo la expresión de *stg*. Dado que Da es un factor de transcripción, el mecanismo más sencillo para explicar esta regulación sería que Da actuase directamente sobre la región reguladora de *stg*. Aunque Da ha sido descrito como un activador de la transcripción (Cabrera y Alonso, 1991; Jarman *et al.*, 1993), también se ha propuesto que puede actuar como represor a través de la formación de heterodímeros con otras bHLH, como ocurre durante la miogénesis embrionaria, donde al formar heterodímeros con Twist se comporta como un represor transcripcional (Castanon *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2008). El gen *stg* posee una región reguladora que abarca toda la región no codificante que se encuentra en posición 5' del inicio

de la transcripción, compuesta por unas 40Kb (Lehman *et al.*, 1999). Esta región contiene múltiples elementos reguladores, incluidos varios sitios putativos de unión para Da. Se ha descrito que Da se une a sitios consenso del ADN denominados “E-boxes” de clase A, de secuencia CACCTG o CAGCTG (Ohsako *et al.*, 1994). Según las observaciones realizadas por Lehman *et al.* (1999), la función de *stg* en los discos imaginales depende parcialmente de elementos reguladores situados entre -1 y +5 Kb del gen *stg*. En concreto, se ha descrito que existe una región promotora mínima de 0,7 Kb en la región situada en posición 5’ del inicio de la transcripción que es necesaria para el crecimiento de los discos imaginales. Estos autores (Lehman *et al.*, 1999) generaron una colección de líneas reporteras que contenían distintos fragmentos de la región reguladora de *stg* fusionados al gen LacZ, que dirige la expresión de la proteína β -Galactosidasa (β -Gal). Así, utilizando estas líneas reporteras es posible analizar la función de distintas regiones del promotor de *stg* en la regulación transcripcional de este gen. Analizamos si las líneas *pstg* β , *pstg* β -2.2 y *pstg* β -3.2, que contienen la región del promotor mínimo, podían reproducir el patrón de *stg* en los discos imaginales (Figura R14 A). Para ello, realizamos tinciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo anti- β -Gal en discos de segundo y tercer estadio larvario. En ninguna de las líneas analizadas observamos expresión de β -Gal en los discos de ala-notum, pata y ojo-antena (datos no mostrados). La línea *pstg* β mostró expresión de β -Gal en algunas células del cerebro, que por su tamaño podrían ser neuroblastos. Estos resultados indican que ninguna de estas líneas contiene las regiones reguladoras que controlan la expresión de *stg* durante del desarrollo de los discos, de manera que estos elementos deberían encontrarse en otras regiones del promotor de *stg*.

A la vista de estos resultados decidimos analizar el patrón de expresión de una colección de líneas *Gal4*, que se encuentran bajo el control de distintos fragmentos de regiones no codificantes o intrónicas del genoma de *Drosophila* (líneas GMR_Brain_exp_1 o Rubin *Gal4* lines, Janelia farm; Figura R14 A). Seleccionamos aquellas líneas que contenían fragmentos de la región reguladora de *stg* y las cruzamos con *UAS-GFP* para observar su patrón de expresión en el disco imaginal de ala. Así, encontramos que las líneas *GMR_32B06*, *GMR_32C11* y *GMR_32F08* (Figura R14 A, destacadas en verde) expresaron GFP en discos imaginales de ala de tercer estadio. La línea *GMR_32F08* dirigió la expresión de GFP en todas las células del disco de ala, mientras que las líneas *GMR_32B06* y *GMR_32C11* mostraron un patrón de expresión de GFP restringido (Figura R14 A). Por un lado, la línea *GMR_32B06* expresaba GFP en la región putativa de la axila alar, mientras que en la línea *GMR_32C11* la expresión de GFP se restringía a la región putativa de ala, con niveles más elevados a lo largo del borde D/V, y en una banda de células en torno al borde de compartimento A/P. Este último patrón de expresión es similar al que muestra *stg* en discos imaginales de ala de tercer estadio (Figura R15 M).

4.2. Función de *Daughterless* como represor de elementos reguladores de *string*

Para determinar si alguna de las regiones reguladoras contenidas en las líneas *GMR_32B06*, *GMR_32C11* y *GMR_32F08* podían ser reguladas por Da, analizamos la expresión de las mismas en condiciones de sobre-expresión de *da*. Para ello, combinamos las líneas *Gal4* seleccionadas con *UAS-*

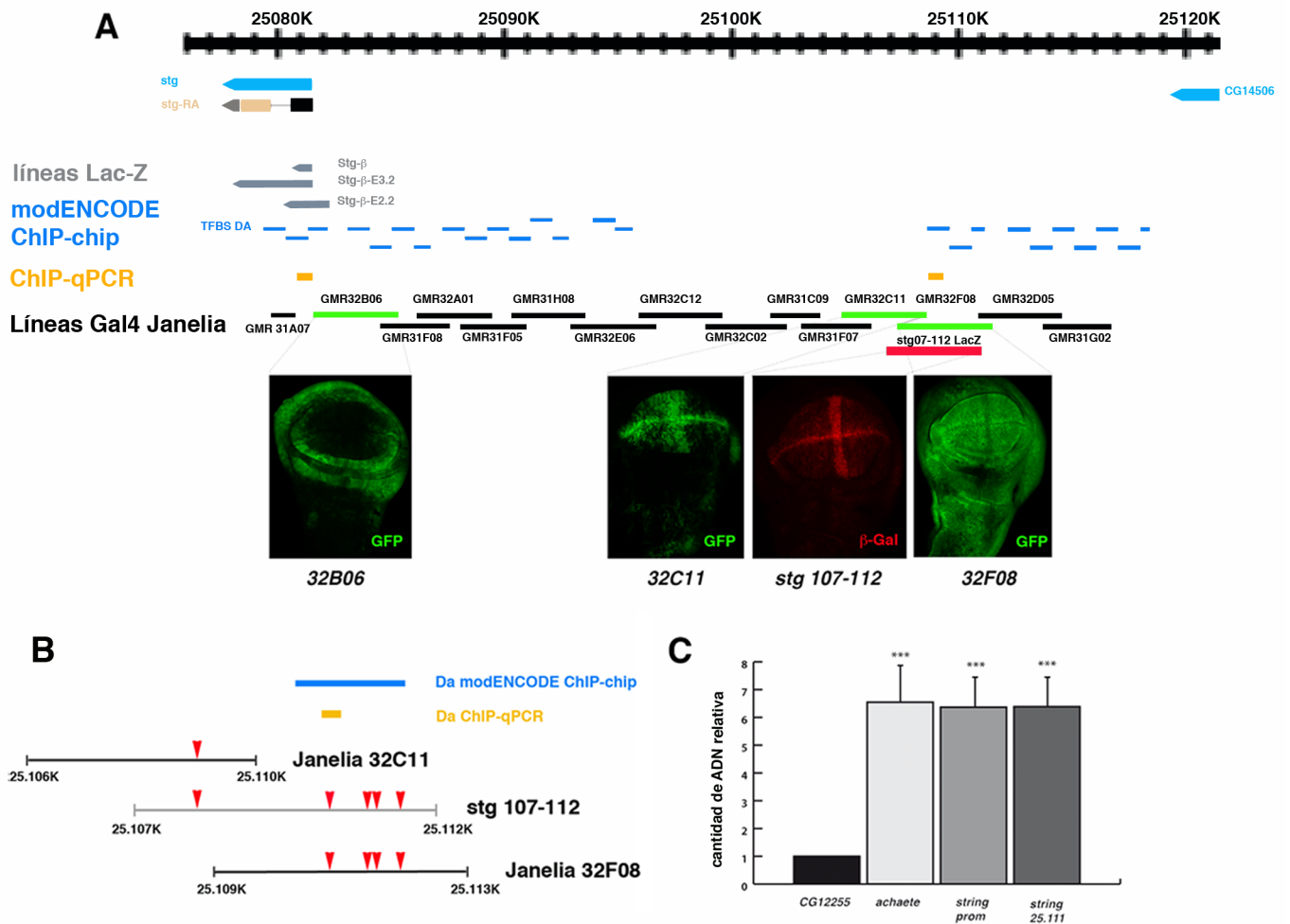


Figura R14: Esquema de la región reguladora de *string* y resultados del experimento de ChIP-qPCR. (A) Representación gráfica de la región reguladora de *stg*. Las líneas lacZ, desarrolladas en el laboratorio de B. Edgar *stg* β, *stg* β-E3.2 y *stg* β-E2.2 se muestran en gris. Los resultados de “ChIP on chip” del proyecto modENCODE para Da se muestran en azul, donde cada línea representa un fragmento de ADN que se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-Da. Las líneas naranjas marcadas como ChIP-qPCR representan los fragmentos estudiados en nuestro laboratorio. Las líneas *Gal4* creadas por Janelia y que mapean a lo largo de la región reguladora de *stg* se muestran en negro. En verde se han señalado las líneas que mostraron expresión en los discos imaginales, que fueron: *GMR_32B06*, *GMR_32C11* y *GMR_32F08*. Además, se muestra el patrón de expresión al que dio lugar cada línea al cruzarla con *UAS-GFP*. También incluimos la línea *stg-107-112-LacZ*, generada en el laboratorio de F. Casares, junto con su expresión en el disco de ala, revelada por tinción con anti-β-Gal (en rojo). Nótese la similitud con la línea *GMR_32C11*. **(B)** Detalle del fragmento de la región reguladora de *string* incluida en las líneas *GMR_32C11*, *GMR_32F08* y *stg-107-112-LacZ*. Los sitios putativos de unión de Da presentes en estas regiones se muestran con una punta de flecha roja. También se muestran el sitio de unión de Da encontrado por el proyecto modENCODE (línea azul) y el analizado en nuestro laboratorio (línea naranja) perteneciente a esa región. **(C)** Representación gráfica del experimento de ChIP-qPCR realizado en nuestro laboratorio. Cada barra representa la cantidad de ADN relativa inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-Da. El gen *CG12255* se utilizó como control negativo del experimento. El promotor de *achaete* se utilizó como control positivo. Los fragmentos marcados con una línea naranja en A y B, llamados *stg prom* y *stg 25.111* en C, se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Da en niveles similares a los encontrados para el control positivo, *achaete* (n=4 experimentos independientes, p-valor<0,001 respecto a *CG12255*).

GFP y *UAS-da*, y estudiamos los niveles de *GFP* en discos de tercer estadio larvario. Cuantificamos la intensidad de la expresión del reportero *GFP* en discos control (sin *UAS-da*) y los comparamos con los niveles de expresión en discos que sobre-expresaban *da* (ver Materiales y Métodos). Encontramos que el incremento de *Da* redujo los niveles de expresión de *GFP* en las 3 líneas analizadas (Figura R15 A-I). Además, la sobre-expresión de *da* bajo el control de dos de estas líneas *Gal4*, *GMR_32B06*, y *GMR_32C11*, redujo no sólo los niveles de expresión de la *GFP*, sino también el número de células que expresaban *GFP* (Figura R15 A-C y G-I). En el caso de la línea *GMR_32F08* la expresión de *GFP* se mantuvo en todas las células del disco, pero a niveles muy reducidos con respecto a los discos control (Figura R15 D-F).

Para profundizar en el estudio del papel de *Da* como represor transcripcional de *stg*, utilizamos una construcción reportera *LacZ*, denominada *stg-107-112-LacZ* (generada en el laboratorio de F. Casares, Figura R14 A, destacada en rojo). Esta línea contiene un fragmento de la región reguladora de *stg* que incluye casi por completo las regiones contenidas en las líneas *GMR_32C11* y *GMR_32F08* (Figura R14 B). Esta construcción dirigió la expresión de β -Gal a todas las células de la región presuntiva de ala, con niveles marcadamente más altos en las células del borde D/V y a lo largo del eje A/P, expresión similar a la observada con la línea *GMR_32C11* (Figuras R15 J-J' y R14 A). El patrón de expresión de esta línea es muy similar al que muestra *emc-GFP* en discos de tercer estadio larvario (Figura R15 L-L', comparar con L''). Cuando sobre-expresamos *da* en el compartimento dorsal, dirigido por la línea *ap-Gal4* (*UAS-da/stg-107-112-LacZ*; *ap-Gal4/UAS-GFP*) observamos una fuerte reducción de la expresión de β -Gal en todas las células del compartimento dorsal, aunque este descenso fue más evidente en la banda de expresión a lo largo del borde A/P. Sin embargo, la expresión de esta línea en el eje D/V no se modificó por la sobre-expresión de *da* (Figura R15 K' comparar con el control J').

La reducción de la función de *da*, mediante la expresión de *UAS-da^{ARNi}* en el compartimento posterior (*en-Gal4-UAS-GFP/stg-107-112-LacZ*; *UAS-da^{ARNi}*) no modificó la expresión del reportero *stg-107-112-LacZ* (Figura R15 N-N'). Este resultado concuerda con los resultados anteriormente descritos que mostraban que la disminución de *da* no es suficiente para incrementar la expresión de *stg* (Figura R13 B).

En conjunto, nuestros resultados indican que *da* es capaz de reprimir transcripcionalmente distintos elementos reguladores presentes en la región promotora de *stg*.

4.3. Estudio de la unión directa de *Daughterless* a la región promotora de *string*

Como hemos mencionado anteriormente, en la región reguladora de *stg* existen múltiples sitios putativos de unión para *Da*. Recientemente, se ha realizado un análisis a gran escala que define el patrón de unión al genoma de *Drosophila* de 38 factores de transcripción, basado en datos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP on chip, *modENCODE cis-regulatory annotation project*; Negre *et al.*, 2011). Entre los factores de transcripción escogidos para este análisis, se encuentra *Da*. Los datos presentes en este estudio indican que *Da* se une *in vivo* a múltiples regiones del

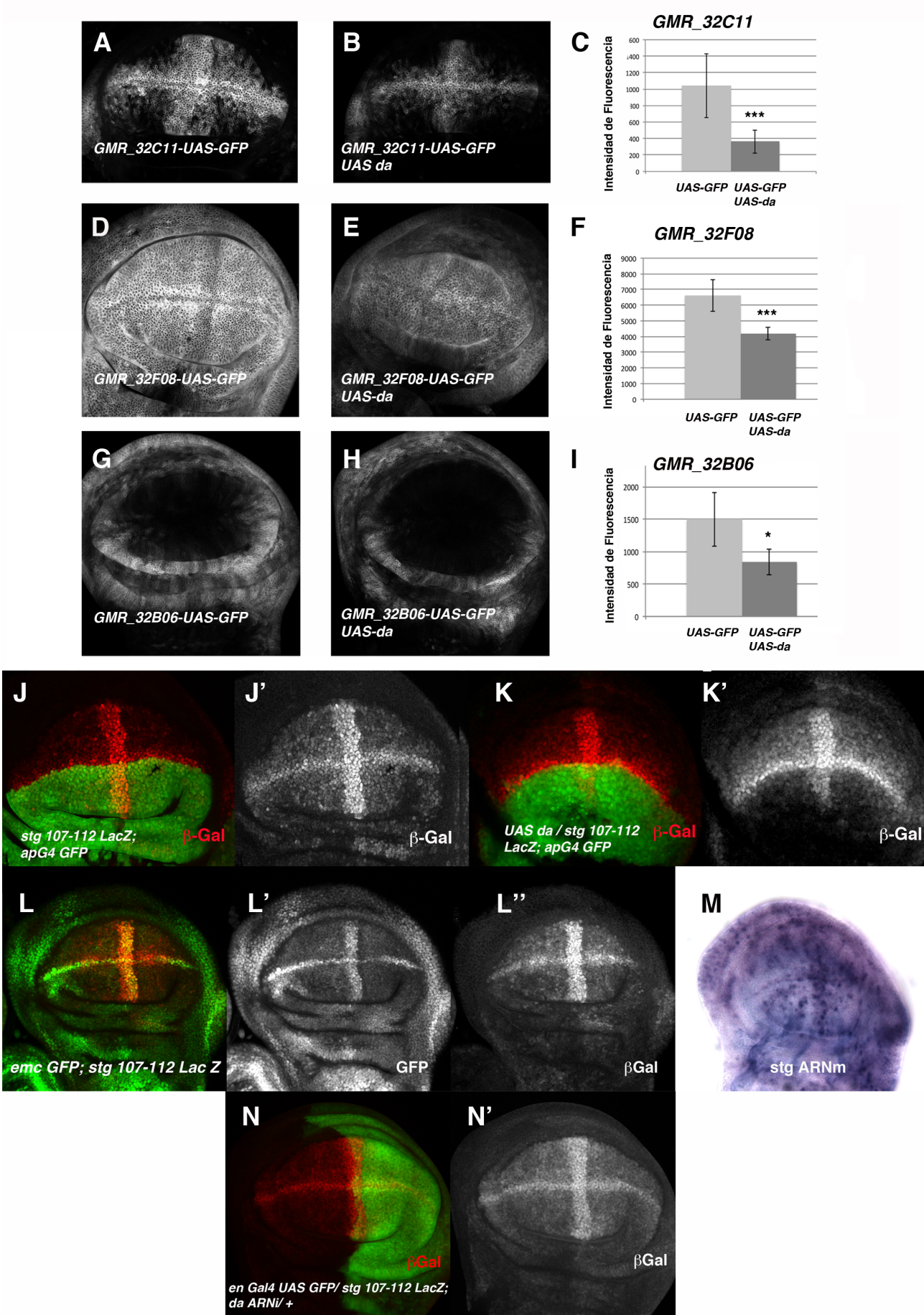


Figura R15: Regulación por Da de los distintos reporteros de la expresión de *string*. (A, B, D, E, G y H) Discos de ala de tercer estadio larvario que muestran la expresión de *UAS-mCD8-GFP* (en gris) dirigida por las líneas *Gal4 GMR_32C11*, *GMR_32F08*, y *GMR_32B06*, en discos control (A, D y G), o que sobre-expresaron *UAS-da*: *GMR_32C11-Gal4 UAS-mCD8-GFP/ UAS-da* (B), *GMR_32F08-Gal4 UAS-mCD8-GFP/ UAS-da* (E), y *GMR_32B06-Gal4 UAS-mCD8-GFP/ UAS-da* (H). (C, F, I) Gráficos que representan los niveles medios de expresión de GFP en controles (*UAS-GFP*) y en discos que sobre-expresaron *UAS-da* y *UAS-GFP*, dirigidos por las líneas *GMR_32C11* (C), *GMR_32F08* (F) y *GMR_32B06* (I). En cada experimento se cuantificaron al menos 9 discos (**p-valor<0,001 y *p-valor<0,05 respecto al control). La sobre-expresión de *da* causó la reducción de los niveles de *UAS-GFP* en todos los casos. (J, K) Discos de ala de tercer estadio larvario teñidos con anti-β-Gal, que muestran el patrón de expresión de la línea *stg-107-112-LacZ* (en rojo en J, K y en gris en J', K'). En los discos *stg-107-112-LacZ/ UAS-da*; *ap-Gal4/ +* (K, K') la expresión del reportero se vio fuertemente reducida en el compartimento dorsal debido a la sobre-expresión de *da* (marcado por la expresión de GFP, en verde), en comparación con los discos control (J, J'). (L-L'') Comparación del patrón de expresión de *emc* (revelado por la expresión del reportero *emc-GFP*, en verde en L y en gris en L'), con la expresión del reportero *stg-107-112-LacZ* (en rojo en L y en gris en L''). Ambos reporteros se expresaron de forma similar en la región presuntiva de ala. (M) Ejemplo de hibridación *in situ* con sonda de ARNm contra *string*, en un disco silvestre. La expresión de *stg* fue similar a la de *emc* y el reportero *stg-107-112-LacZ*, observándose una línea de expresión en el borde D/V y a lo largo del eje A/P. (N, N') Expresión de β-Gal (en rojo en N y en gris en N') en discos de ala de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/ stg-107-112-LacZ; UAS-da^{ARNi}/ +*. No observamos cambios en la expresión del reportero de la expresión de *stg* al disminuir los niveles de *da*.

promotor de *stg* (Figura R14 A y B, en azul). Quisimos corroborar las evidencias encontradas en el proyecto modENCODE realizando un experimento adicional de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-qPCR), centrado en la unión de Da a la región promotora de *stg*. Para ello, analizamos la posible unión de Da a dos regiones concretas del promotor de *stg*. La primera está situada entre los nucleótidos 25.081.039 – 25.081.121 del cromosoma 3R (Figura R14 A en naranja, llamada *string prom* en C), y contiene un sitio putativo de unión para Da. Esta región se encuentra dentro del promotor mínimo que, como comentamos en el apartado 4.1, ha sido descrito como necesario para la regulación transcripcional de *stg* en los discos imaginales (Lehman *et al.*, 1999). La segunda región escogida se encuentra entre los nucleótidos 25.111.328 – 25.111.401 del cromosoma 3R. Este fragmento contiene un sitio de unión para Da y se encuentra situado aproximadamente 29 Kb por encima del inicio de la transcripción (Figura R14 A y B en naranja, llamada *string 25.111* en C). Este fragmento está incluido en la región reguladora que hemos identificado en nuestro análisis como necesaria para controlar la expresión de *stg* en los discos imaginales, dentro de la cual hay varios sitios putativos de unión de Da (Figura R14 B). Los datos derivados del proyecto modENCODE indican que Da se une *in vivo* a las dos regiones del genoma que hemos analizado. Además, hemos incluido como control positivo el promotor de *achaete*, ya que ha sido ampliamente demostrado que Da se une a esta región (Murre *et al.*, 1989b; Ohsako *et al.*, 1994), y como control negativo, al gen *CG12255*, que codifica para la Proteína Cuticular 72Eb, en la que no hemos encontrado ningún sitio putativo de unión para Da. Los resultados obtenidos muestran que las regiones escogidas del promotor de *stg* (*string prom* y *string 25.111*) aparecían enriquecidas en el inmunoprecipitado hasta 6 veces más que el gen control (*CG12255*). Este enriquecimiento fue similar al observado para el promotor de *achaete* (Figura R14 C).

Así pues, nuestros datos, junto con los datos del proyecto modENCODE, muestran que Da se une *in vivo* a distintas regiones del promotor de *stg*, incluidas las regiones que controlan la expresión de *stg* en los discos imaginales.

Para evaluar si la unión de Da al promotor de *stg* es directa, realizamos un ensayo de Retardo en Gel. Para llevar a cabo este experimento, en primer lugar diseñamos sondas marcadas con los fluoróforos Cy3 y Cy5, que contenían la secuencia de uno de los dos sitios de unión para Da que encontramos en el promotor mínimo de *stg* (Figura R16 A) (Ohsako *et al.* 1994). En la figura R16 B se muestra un ejemplo representativo del ensayo de Retardo en Gel, separando los dos canales de fluorescencia empleados. Las sondas unidas a la proteína de fusión (calles 6-12) corren retardadas con respecto a las que no tienen añadida proteína, o no se unen a ésta. En las calles 6 y 7 se puede observar la unión de la proteína de fusión Da-GST a las sondas marcadas, bien con el fluoróforo Cy3 (visualizado en la imagen en verde, calle 6) o bien con el fluoróforo Cy5 (visualizado en la imagen en rojo, calle 7). Este resultado indica que Da se une al sitio putativo de unión contenido en el promotor mínimo de *stg*. Para determinar la especificidad de esta unión, realizamos un ensayo de competición. Para ello, diseñamos sondas marcadas con el fluoróforo Cy5, en las cuales se mutó el sitio de unión de Da, cambiando las bases púricas por pirimidínicas. En este experimento, ensayamos si la sonda con el sitio de unión normal (*stg prom Cy3*, en verde) pero en cantidad 10 veces superior, era capaz de competir con la sonda normal (*stg prom Cy5*, en rojo, calle 10), o bien con la sonda mutada (*stg prom Cy5**, en rojo, calle 12). Como se puede observar en la figura, la sonda de secuencia normal marcada con Cy5 (*stg prom Cy5*) compitió por la unión con la proteína Da-GST (calle 10). Sin embargo, cuando se realizó el mismo ensayo con la sonda que contenía el sitio de unión mutado (*stg prom Cy5**), ésta no fue capaz de competir con la sonda de secuencia normal (calle 12), quedando la mayor parte de la proteína unida a la sonda control (*stg prom Cy3*). Así, podemos concluir que Da se une específicamente *in vitro* al promotor de *stg* sin mediación de otras proteínas de la familia bHLH.

4.4. Estudio *in vitro* de la represión del promotor mínimo de *string* mediada por *Daughterless*

Para estudiar si la expresión ectópica de Da era suficiente por sí sola de reprimir transcripcionalmente a *stg*, analizamos la actividad de un reportero para este gen en la línea de células embrionarias de *Drosophila* S2. En esta línea de células no se expresan la mayoría de las proteínas bHLH de clase II, específicas de tejido (Flybase). Para realizar este experimento, analizamos la actividad del gen de la *luciferasa*, bajo el control del promotor mínimo de *stg* de 0,7 Kb, que contiene dos sitios de unión putativos para Da (Figura R16 A). Para ello, clonamos esta región del promotor de *stg* en el vector pGL2, al cual se adicionó un promotor mínimo de activación HS43 (*pGL2 stg*). La transfección del vector vacío en las células S2 (pGL2) produjo un incremento leve de la actividad de Luciferasa, que definimos como valor 1. El resto de las medidas se representaron respecto a ese valor (Figura R16 C). La transfección del promotor mínimo de *stg* (*pGL2-stg*) produjo un incremento notable de la actividad de Luciferasa ($3,74 \pm 0,5$ Unidades Relativas de Luciferasa (URL)), probablemente debido a la presencia de factores de transcripción que activan de forma

construcción mutante apenas observamos aumento de la actividad de Luciferasa ($1,43 \pm 0,3$ URL). Este resultado sugiere que los sitios de unión de Da contenidos en esta región son necesarios para promover la actividad normal de este reportero. Cuando se co-expresó Da junto con el reportero mutante, no observamos diferencias en la actividad de Luciferasa respecto a la mostrada por el reportero mutante solo ($1,35 \pm 0,5$ URL).

4.5. Análisis del promotor mínimo de *string* como región represora

En el apartado anterior, hemos mostrado cómo Da puede unirse al promotor mínimo de *stg* y reprimirlo. Como ya hemos comentado anteriormente, esta región no es suficiente para activar la expresión de *stg* en los discos imaginales, ya que se necesita la presencia de otros elementos activadores ubicados en otras regiones del promotor (descritas en el apartado 4.1). Estas observaciones sugieren que la región del promotor mínimo de *stg* puede comportarse *in vivo* como una región represora de la transcripción de *stg*, a la cual podrían unirse distintos reguladores negativos, entre los que se podría encontrar Da. Para evaluar esta hipótesis, clonamos esta región promotora delante de la construcción *sal^{EPV}-eGFP* (cedido por el laboratorio de J.F. de Celis, Figura R17 A). La región *sal^{EPV}* contiene varios elementos reguladores que dirigen la expresión de GFP a la región central del disco de ala. Encontramos que cuando introdujimos la región promotora mínima de *stg* en este vector (*stg prom-sal^{EPV}-eGFP*), ésta se comportó como un fuerte represor de la expresión de la línea *sal^{EPV}-eGFP*, ya que no observamos presencia alguna de GFP en la región central del ala (Figura R17 B, comparar con A). Para evaluar si los sitios de unión de Da contenidos en el promotor mínimo de *stg* eran necesarios para su función represora sobre la construcción *stg prom-sal^{EPV}-eGFP*, mutamos los dos sitios que se ubican dentro de esta región. Cuando clonamos esta forma mutada del promotor mínimo de *stg* delante de *sal^{EPV}-eGFP* (*stg prom*-sal^{EPV}-eGFP*) encontramos que la expresión de GFP dirigida por *sal^{EPV}* se restablecía por completo, obteniéndose discos iguales al control (comparar Figura R17 C comparar con A).

Obtuvimos resultados similares cuando generamos un reportero GFP dirigido por la región promotora mínima de *stg*. Así, encontramos que mientras que el reportero *stg prom-eGFP* no mostró expresión en el disco de ala (Figura R17 D), una forma mutante del mismo en la que se eliminaron los sitios putativos de unión de Da (*stg prom*-eGFP*) expresó bajos niveles de GFP por todo el disco de ala (Figura R17 E, la intensidad de fluorescencia está cuantificada en F).

En conjunto, estos datos indican que los sitios de unión de Da presentes en el promotor mínimo de *stg* se comportan como elementos represores de la regulación de la transcripción. De acuerdo con estos resultados, una disminución de la función de *da* debería restaurar la expresión de GFP en los reporteros *stg prom-eGFP* y *stg prom-sal^{EPV}-eGFP*. Para estudiar esta posibilidad, bloqueamos la función de *da* en discos de genotipo *en-Gal4; UAS-da^{ARNi}/stg prom-sal^{EPV}-eGFP*. Observamos que en estos discos, a pesar de que los niveles de Da estaban fuertemente disminuidos en el compartimento posterior (Figura R17 G y G'), la expresión de GFP en la región *sal^{EPV}* de este compartimento no se

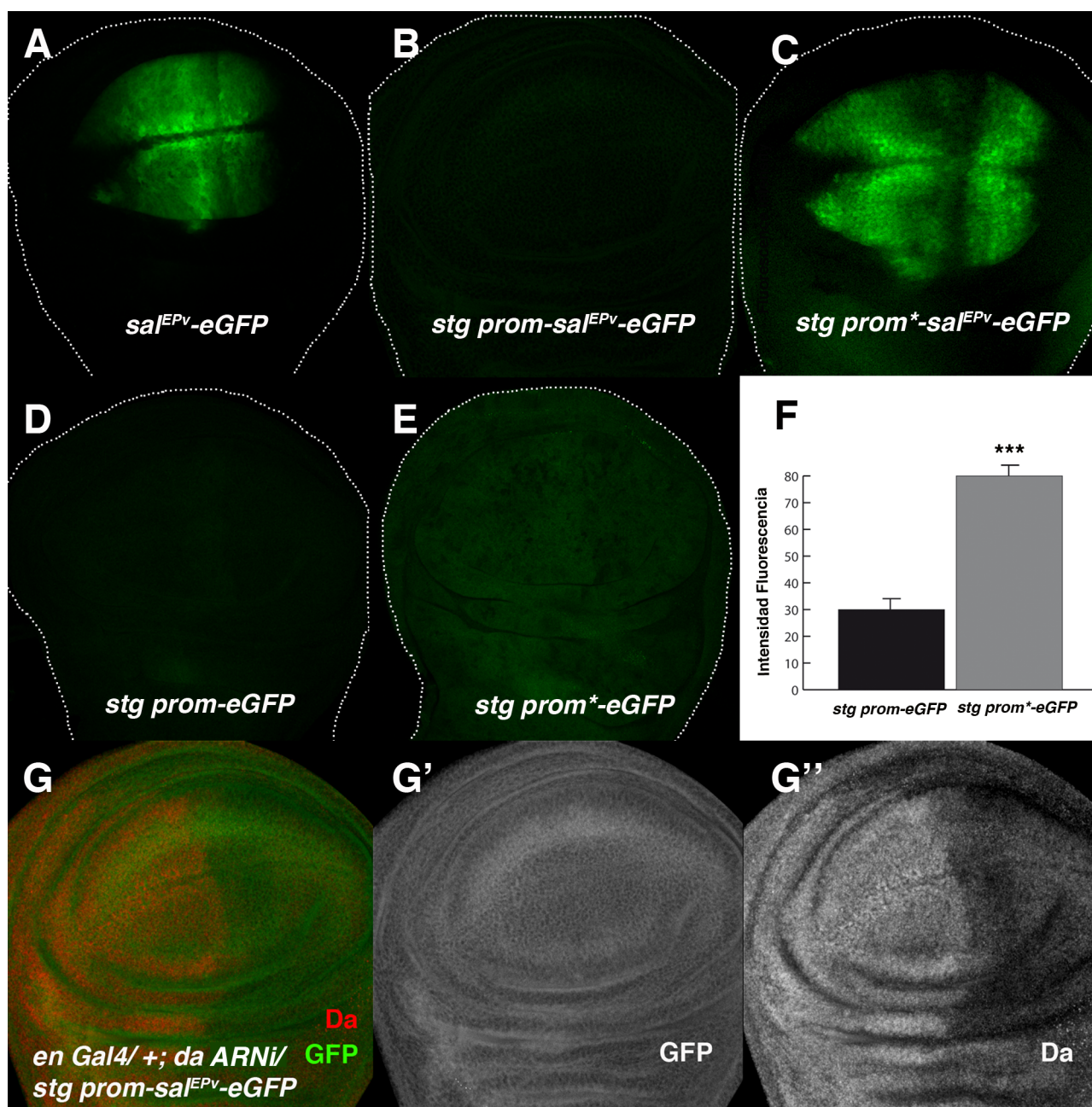


Figura R17: Expresión *in vivo* de la región promotora mínima de *string*. (A-C) Disco de ala de tercer estadio larvario que muestra la expresión del reportero *sal^{EPV}-eGFP* (generado en el laboratorio de J.F. de Célis) (A), que muestra la expresión de GFP (en verde) dirigida por la región reguladora *sal^{EPV}*. (B) Expresión del reportero *stg prom-sal^{EPV}-eGFP*, que contiene la región promotora mínima de *stg* delante de la región *sal^{EPV}*. La expresión de GFP se vio completamente suprimida por la adición de esta región reguladora. (C) Expresión del reportero *stg prom*-sal^{EPV}-eGFP*, en el que se mutaron los dos sitios de unión de Da presentes en la región reguladora de *stg*. La expresión de GFP se re-estableció por completo debido a la eliminación de los sitios de unión de Da. (D-F) Expresión de la región promotora mínima de *stg*, visualizada por la expresión de GFP, en discos con las construcciones *stg prom-eGFP* (D) y *stg prom*-eGFP*, en el que se mutaron los sitios de unión de Da (E). La eliminación de los citados sitios causó un aumento de la expresión de GFP por todo el disco (comparar E con D, cuantificado en F, n=10 discos por genotipo, ***p-valor<0,001). (G) Disco de ala de tercer estadio larvario de genotipo *en-Gal4/+; UAS-da^{ARNi}/ stg prom-sal^{EPV}-eGFP*, en el que se muestra la expresión de Da (en rojo en G y en gris en G'') y de GFP (en verde en G y en gris en G'). La reducción de la expresión de *da* en el compartimento posterior no provocó el aumento de la expresión de GFP en la región *sal^{EPV}* (G, G').

restauró (Figura R17 G-G'). Tampoco encontramos un aumento de la expresión de GFP al reducir la función de *da* en discos de genotipo *en-Gal4; UAS-da^{ARNi}/stg prom-eGFP* (datos no mostrados).

Con los resultados mostrados podemos afirmar que las E-boxes presentes en el promotor mínimo de *stg* son fundamentales para que esta región se comporte como un represor de la transcripción de *stg*.

4.6. Análisis del papel del dominio de represión "Rep" en la función de Daughterless como represor de *string*

La proteína Da contiene diferentes dominios. Además de la región HLH, presenta un dominio compuesto por 30 aminoácidos (dominio *Rep*) que se requiere para que Da funcione como inhibidor de la diferenciación miogénica en células de ratón (Markus *et al.*, 2002). Esta función parece estar conservada también en *Drosophila* (Wong *et al.*, 2008). Quisimos saber si este dominio era necesario para la función represora que Da ejerce sobre la transcripción de *stg*. Para ello, sobre-expresamos en primer lugar una forma truncada de Da que carecía del citado dominio de represión, empleando la línea *sal^{EPV}-Gal4 (sal^{EPV}-Gal4/ UAS-da-Δ-Rep; Wong et al., 2008)*. Si este dominio fuera importante en la función de Da como inhibidor de la proliferación, al eliminarlo no se observaría una reducción del tamaño del ala debido a su sobre-expresión, como ocurre cuando sobre-expresamos la forma silvestre. Cuando comparamos las alas de moscas *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da-Δ-Rep* con alas control *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP* y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da* encontramos que no existía ninguna diferencia significativa entre los fenotipos de sobre-expresión de la forma silvestre de *da* y la forma mutada *da-Δ-Rep* (Figura R18 C comparar con B). Para corroborar que durante el desarrollo larvario la ausencia del dominio *Rep* no modifica los defectos proliferativos que hemos descrito que produce la sobre-expresión de *da*, realizamos tinciones con PH3 en discos de tercer estadio de genotipos *sal^{EPV}-Gal4-UAS-GFP*, *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da* silvestre y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da-Δ-Rep*. Tampoco en este caso observamos diferencias en el número de células en mitosis en los discos de ala que sobre-expresaron la forma silvestre de *da*, con respecto a la forma mutada *da-Δ-Rep* (índice mitótico *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP*: $3,01 \pm 0,04$, *sal^{EPV}-Gal4-UAS-GFP/ UAS-da* silvestre: $1,17 \pm 0,04$ y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da-Δ-Rep*: $1,68 \pm 0,18$, Figura R18 D-G). Además, cuando analizamos mediante hibridaciones *in situ* la expresión del ARNm de *stg* en los discos de larvas de los genotipos anteriormente mencionados, no encontramos diferencias entre los discos que sobre-expresan la forma mutada de Da y la forma silvestre (Figura R18 J comparar con I).

Estos resultados indican que el dominio de represión *Rep* no es importante para la función de Da en el control de la proliferación y el ciclo celular. Es posible que este dominio esté especializado en mediar las funciones de Da para promover la diferenciación en ciertos tipos celulares.

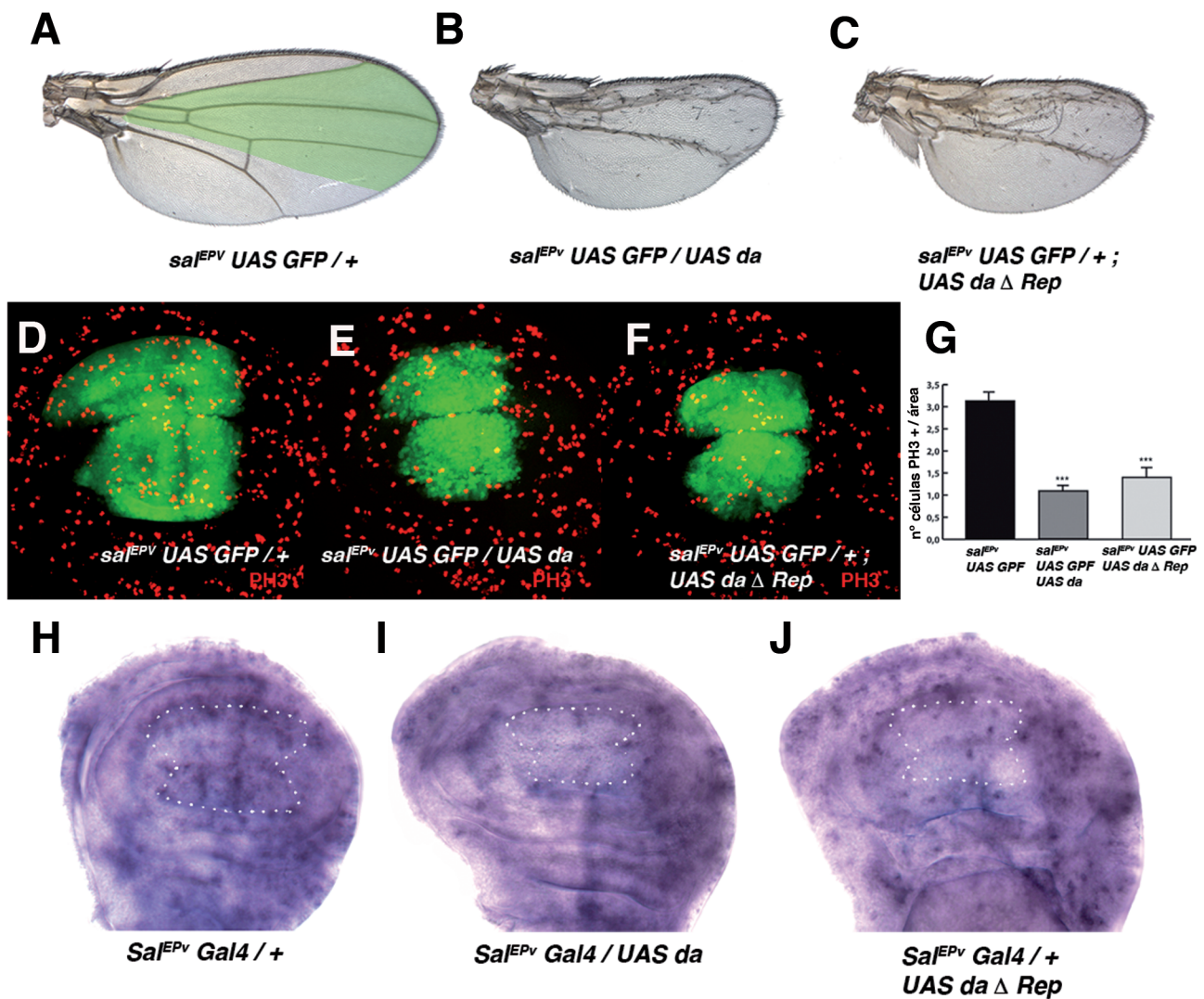


Figura R18: Efectos de la eliminación de la región Rep en los fenotipos de sobre-expresión de *da* en el ala. (A-C) Alas adultas de genotipo *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ +* (A), *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da* (B), y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da- Δ -Rep* (C). La sobre-expresión de la forma mutada de *da* (*UAS-da- Δ -Rep*) dio lugar al mismo fenotipo que la sobre-expresión que la forma silvestre de *da* (comparar B y C). (D-G) Expresión de PH3 (en rojo) en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario (D-F) y cuantificación del índice mitótico en el área *sal^{EPV}* de los genotipos mencionados en A-C. Los defectos mitóticos observados al sobre-expresar la forma silvestre de *da* fueron similares a los observados cuando se eliminó el dominio “Rep” ($n=10$, ***p-valor<0,001 respecto al control *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP*). (H-J) Hibridaciones *in situ* realizadas con una sonda que reconoce el ARNm de *stg*, en discos de ala de tercer estadio larvario de igual genotipo que en A-C. La región presuntiva de expresión *sal^{EPV}* se ha marcado con una línea de puntos. La expresión de *stg* se redujo de manera similar al sobre-expresar la forma silvestre (*UAS-da*) o la forma mutante (*UAS-da- Δ -Rep*) de *da* (comparar I con J).

5. Implicación de los complejos Ac/Sc y E(spl) en los efectos de *da* como inhibidor de la proliferación

5.1. Estudio de la relación del complejo achaete-scute y *da*

Los resultados mostrados hasta ahora indican que *Da* funciona como un represor directo de la transcripción de *stg*. Además, sugieren que, al menos *in vitro*, *Da* podría realizar esta función sin la mediación de otras bHLH. Sin embargo, nuestros datos no nos permiten descartar que algunas de las proteínas bHLH que se expresan durante el desarrollo de los discos puedan estar formando heterodímeros con *Da* para mediar su función represora sobre el promotor de *stg*. De hecho, como hemos comentado anteriormente que ocurre durante la miogénesis somática (Wong et al., 2008), *Da* puede funcionar como un represor o activador transcripcional dependiendo de con qué bHLH interaccione.

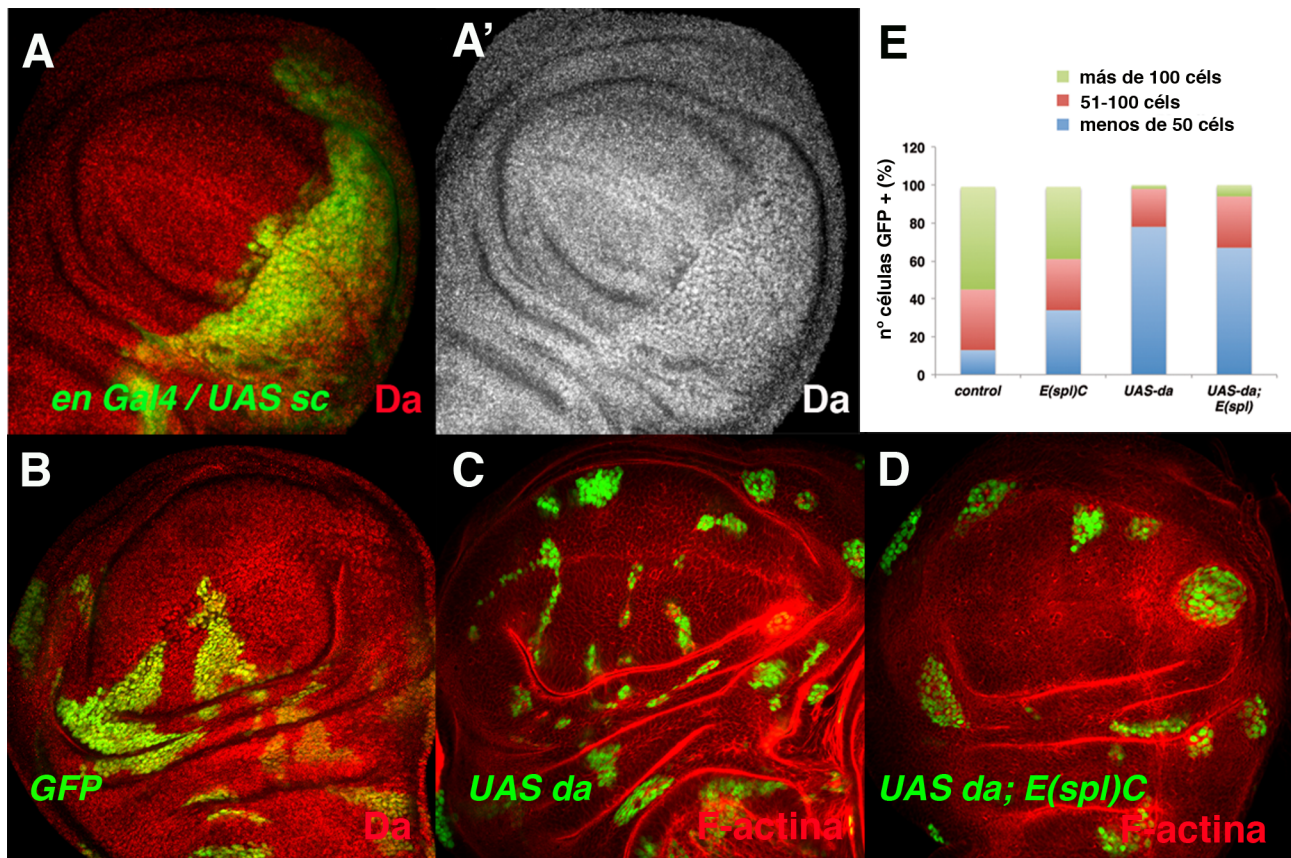


Figura R19: Función de los complejos proteicos Ac-Sc y E(spl) como mediadores de las funciones de *Da* sobre la proliferación celular. (A) Disco de ala de tercer estadio larvario de genotipo *en-Gal4/ UAS-sc*, teñido con anti-*Da* (en rojo en A y en gris en A'). La expresión de *Da* aumentó cuando se sobre-expresó *UAS-sc*. (B-D) Clones de células de genotipo control (B), *UAS-da* (C) y *UAS-da; E(spl)^{b32.2}* (D) en discos de ala de tercer estadio larvario, marcados por la presencia de GFP (verde). Los discos muestran además la expresión de *Da* (B) o F-actina (C, D). (E) Representación gráfica de la distribución por tamaños que presentaron los clones control, *E(spl)^{b32.2}*, *UAS-da*, y *UAS-da; E(spl)^{b32.2}*. La eliminación del complejo *E(spl)* no varió de forma significativa el tamaño de los clones de sobre-expresión de *da*, que en su mayoría contenían menos de 50 células.

Durante el desarrollo de los discos imaginales, los genes proneurales *achaete* y *scute* (*ac/sc*) se expresan en el borde D/V para generar el patrón de los órganos sensoriales del margen del ala. Durante este periodo, las células del margen (en el compartimento anterior) se encuentran paradas en fase G2 del ciclo, de modo que se ha sugerido que los altos niveles de Sc presentes en esta zona reprimen la expresión de *stg*, lo que da lugar a que el ciclo se pare en G2 (Johnston y Edgar, 1998). Por lo tanto, es posible que estos genes proneurales estén interaccionado con Da para mediar su acción represora. Sin embargo, se ha observado que la eliminación de *ac-sc* no es capaz de revertir los defectos proliferativos de las células mutantes para *emc*, ya que clones deficientes para *emc* y el complejo *ac-sc* (*emc¹ Df(sc)¹⁹*) son similares a los mutantes para *emc* (García-Alonso y García-Bellido, 1988). La represión de *stg* en las células de la llamada “zona de no proliferación” (ZNC, de “Zone of Non proliferating Cells”) podría explicarse si Sc, de forma directa o indirecta, estuviese alterando los niveles de Da. Para estudiar esta posibilidad, analizamos los niveles de expresión de Da en discos en los que sobre-expresamos *sc* bajo el control de *en* (*en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-sc*). Observamos que la expresión de Da en el compartimento posterior de estos discos estaba fuertemente incrementada, con respecto a su expresión en el compartimento anterior (Figura R19 A-A’).

Estos resultados sugieren que Da regula la proliferación de forma independiente de *ac-sc*. Además, también sugieren que la capacidad de Sc para reprimir a *stg*, y por tanto para parar la proliferación en la ZNC, puede deberse a su modulación de los niveles de Da, a través de un mecanismo que podría ser directo o indirecto.

5.2. Estudio del papel de las proteínas del complejo E(*spl*) y Groucho como posibles mediadores de los efectos de Da sobre la proliferación

Las proteínas del complejo E(*spl*) se expresan en todas las células epiteliales y son importantes durante el desarrollo del ala como mediadores de la diferenciación de órganos sensoriales y la especificación de las venas. Además, controlan la proliferación celular en respuesta a la activación de la ruta de Notch (San Juan *et al.*, 2012). Para estudiar si los efectos de Da sobre la proliferación celular podrían estar mediados por las proteínas de este complejo, generamos clones de células en las que *da* estaba sobre-expresado, y que además carecían de los genes del complejo E(*spl*). Para ello utilizamos la deficiencia *E(spl)^{b32.2}*, que elimina a todos los miembros del complejo y al gen *groucho* (*gro*), para el que se han descrito diversas funciones como co-represor (Fisher y Caudy, 1998). Encontramos que los clones doble mutantes (*UAS-da; E(spl)^{b32.2}*) generados a las 60 ± 12 h TPH y analizados 60 ± 12 h después, tenían un tamaño similar al de los clones en los que únicamente sobre-expresamos *da* (Figura R19 D comparar con C, cuantificado en E). Este resultado indica que la sobre-expresión de *da* puede alterar la proliferación celular incluso en ausencia de las proteínas del complejo E(*spl*) y Gro.

6. Emc y Da como integradores de señales intracelulares que controlan la proliferación celular

6.1. *Análisis de la expresión de Emc en condiciones de activación de la vía de Notch*

Dado que Emc actúa como represor de *da*, las señales intracelulares que regulasen la actividad o la expresión de *emc* deberían también modular los niveles de expresión de Da. En trabajos previos, se ha mostrado cómo la vía de señalización de Notch promueve la expresión de *emc* durante el desarrollo de los discos imaginales (Baonza y García-Bellido, 2000). Nosotros hemos confirmado estos resultados, ya que observamos que la expresión de un reportero LacZ de *emc* (*emc^{P5C}*) se encontraba fuertemente incrementada en clones de células que sobre-expresaban una forma constitutivamente activada de Notch (*N^{intra}*) (Figura R20 A-A'). La sobre-expresión de *N^{intra}* aumentó también la expresión de Emc (que se observó con la tinción con el anticuerpo anti-Emc, Figura R20 A y A''). Este resultado confirma que Notch es capaz de activar transcripcionalmente a *emc* durante el desarrollo del disco de ala. Como se puede observar en la Figura R20 A y B, el aumento de actividad de Notch produjo clones de gran tamaño, que además expresaban ectópicamente Wg (en B, B'), como ya se había descrito previamente (Baonza y García-Bellido, 2000).

6.2. *Estudio del efecto de la eliminación de emc y la sobre-expresión de da sobre el aumento proliferativo y los sobre-crecimientos producidos por la activación de la vía de Notch*

Como se ha mostrado aquí y en otros trabajos (Baonza y García-Bellido, 2000; Bray, 2006), la activación ectópica de Notch aumenta la proliferación celular durante el desarrollo del disco de ala. Investigamos si los altos niveles de Emc que se observan en las células en las que Notch ha sido activado eran causantes, al menos en parte, de los sobre-crecimientos producidos por la activación de esta vía. Para ello, generamos clones de células mutantes para *emc* (*emc¹*) que además sobre-expresaban *N^{intra}*. La ausencia de *emc* suprimió completamente los sobre-crecimientos causados por el aumento de la actividad de Notch en el disco de ala. Así, a las 60 ± 12 h tras la inducción, el tamaño de los clones *emc¹; UAS-N^{intra}* fue mucho menor que los clones que expresaban *N^{intra}* ($43 \pm 3,7$ células por clon frente a 273 ± 33 , Figura R20 C comparar con B, cuantificado en D), llegando hasta valores cercanos al control. Además, observamos que la falta de función de *emc* eliminó la mayor parte de la expresión ectópica de Wg que se observaba en los clones de células en los que *N^{intra}* fue sobre-expresado (Figura R20 C-C', comparar con B, B'). Cuando analizamos la expresión de Cut, que también se incrementa ectópicamente en condiciones de activación de la vía de Notch, obtuvimos idénticos resultados (datos no mostrados).

A continuación analizamos si, al igual que la falta de función de *emc* revertía los sobre-crecimientos causados por la activación de Notch, la ganancia de función de *da* producía los mismos efectos. Para ello, comparamos el número de mitosis que encontramos en discos *sal^{EPV}-Gal4 UAS-N^{intra}* con las que observamos en discos *sal^{EPV}-Gal4 UAS-da/ UAS-N^{intra}*. La expresión de la forma activada de Notch produjo un aumento del número de células marcadas con PH3 y del tamaño de la región *sal^{EPV}* (Figura R21 A, cuantificado en C). Estos efectos fueron suprimidos cuando co-expresamos *da*

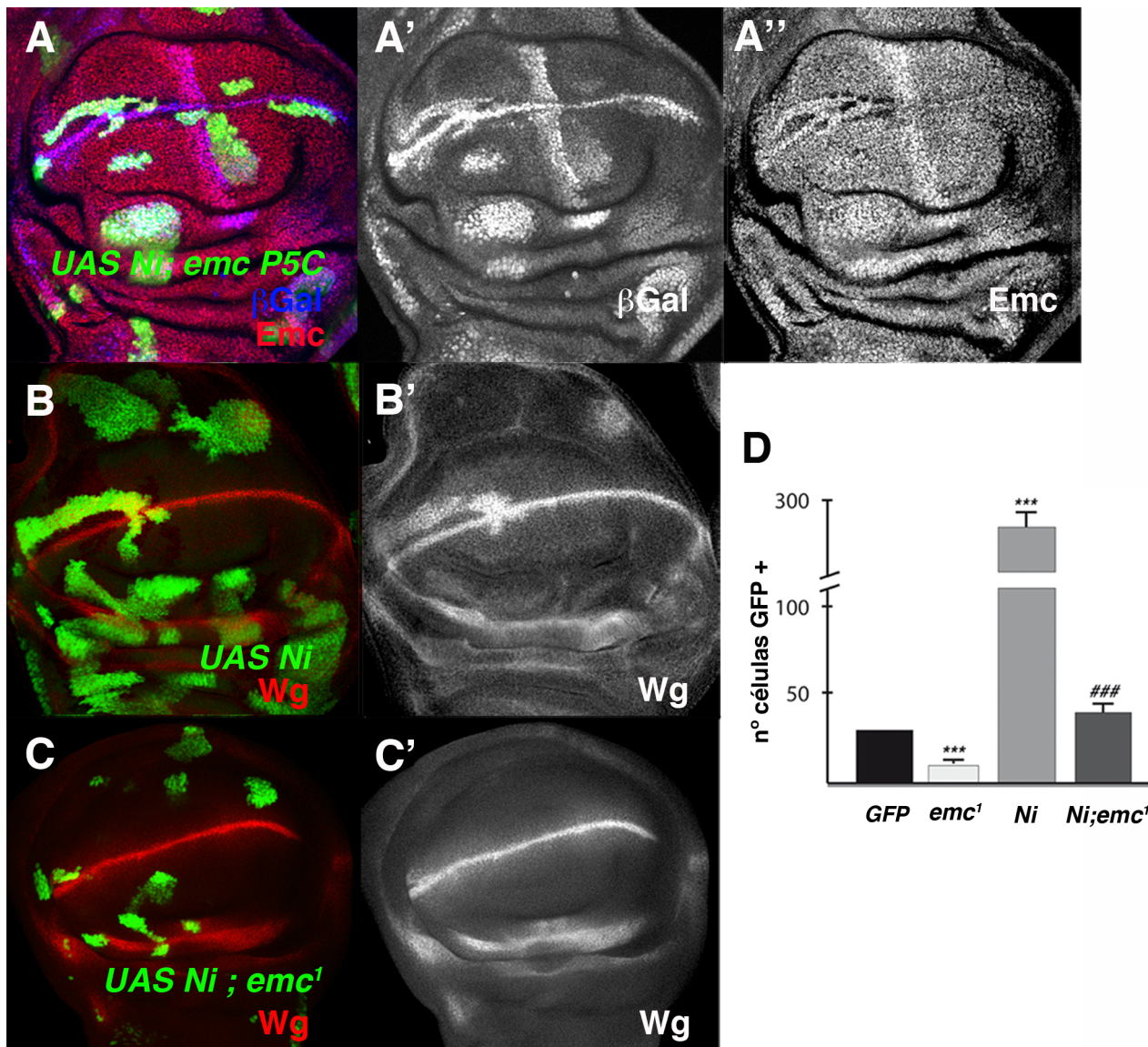


Figura R20: Efectos de la eliminación de *emc* en condiciones de ganancia de función de *Notch*. (A) Clones de células que expresan la región intracelular de Notch (*UAS-N^{intra}*), marcados por la presencia de GFP. Los discos se tiñeron con anti-β-Gal para revelar la expresión del reportero *emc-P5C-LacZ* (en azul en A y en gris en A') y con anti-Emc (en rojo en A y en gris en A''). La sobre-expresión la región intracelular de Notch aumentó la transcripción de *emc* y los niveles de expresión de su proteína. (B, C) Clones de sobre-expresión *UAS-N^{intra}* (B) y *UAS-N^{intra}; emc¹* (C) en los que se muestra la expresión de Wg (en rojo en B, C y en gris en B', C'). (D) Representación gráfica que muestra el tamaño que presentaron los clones en condiciones control (*GFP*), *emc¹*, *UAS-N^{intra}* (*Ni*) y *UAS-N^{intra}; emc¹* (*Ni; emc¹*) ($n > 25$ clones por genotipo estudiado, *** p -valor $< 0,001$ respecto a los clones control, ### p -valor $< 0,001$ respecto a los clones *UAS-N^{intra}*). La barra de la condición *Ni* se ha recortado para facilitar la visualización de los resultados. La eliminación de *emc* suprimió los sobre-crecimientos producidos por la sobre-expresión de *N^{intra}* y disminuyó los niveles de expresión de Wg.

junto con *N^{intra}*, de manera que en estos discos se re-estableció el índice mitótico hasta valores similares al de los controles, y se redujo el sobre-crecimiento de la región *sal^{EPv}* causado por la activación de Notch (índice mitótico *sal^{EPv}-Gal4 UAS-GFP*: $3,01 \pm 0,04$, *sal^{EPv}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da*: $1,71 \pm 0,04$, *sal^{EPv}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-N^{intra}*: $4,25 \pm 0,16$ y *sal^{EPv}-Gal4 UAS-GFP UAS-da/ UAS-N^{intra}*: $3,14 \pm 0,16$, Figura R21 C). Además, observamos que el aumento de los niveles de expresión de Wg

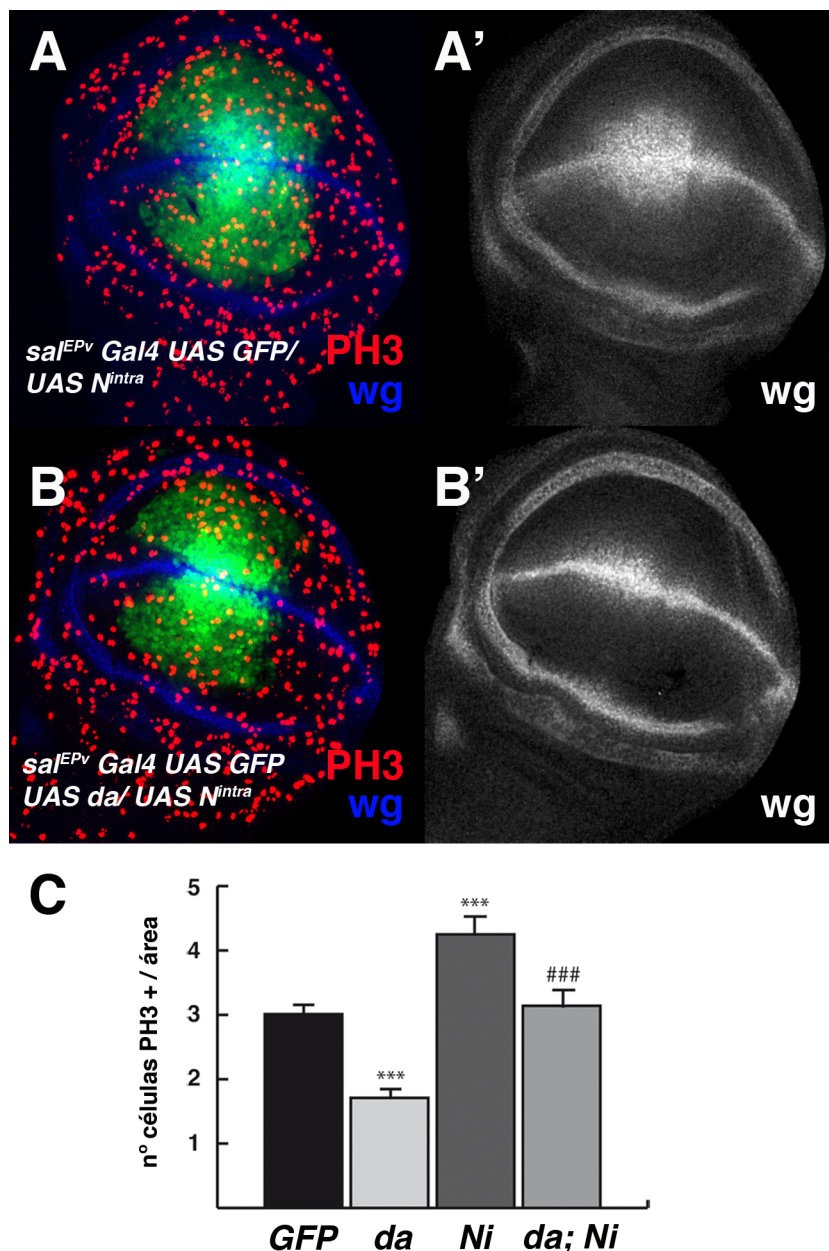


Figura R21: Efectos de la sobre-expresión de *da* en condiciones de ganancia de función de *Notch*. (A, B) Discos de ala de tercer estadio larvario de genotipo *sal^{EPv}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-N^{intra}* (A) y *sal^{EPv}-Gal4 UAS-GFP UAS-da/ UAS-N^{intra}* (B), que muestran la expresión de PH3 (en rojo en A y B) y de Wg (en azul en A y B y en gris en A' y B'). La sobre-expresión de *da* combinada con la sobre-expresión de *N^{intra}* redujo el tamaño de la región *sal^{EPv}* (en verde en A y B) y los niveles de expresión de Wg. (C) Representación gráfica del índice mitótico de los discos de genotipos *sal^{EPv}-Gal4 UAS-GFP/ + (GFP)*, *sal^{EPv}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-da (da)*, *sal^{EPv}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-N^{intra} (Ni)* y *sal^{EPv}-Gal4 UAS-GFP UAS-da/ UAS-N^{intra} (da; Ni)* (n=10 discos por genotipo, ***p-valor<0,001 respecto al control, ###p-valor<0,001 respecto a Ni).

que se produce al sobre-expresar *UAS-N^{intra}* se suprimió notablemente cuando se aumentaron los niveles de *da* (Figura 21 B' comparar con A').

Estos resultados sugieren que el incremento de *emc* inducido por la ruta de Notch es necesario para la formación de los sobre-crecimientos que causa la activación de esta vía durante el desarrollo del disco de ala. Además, ponen de manifiesto cómo la regulación del complejo Emc-Da podría integrar distintas señales celulares para controlar el desarrollo del ala.

7. Análisis de los niveles de expresión de *da* y *emc* durante el desarrollo del disco de ala de *Drosophila*

Las variaciones que sufre el ciclo celular con el avance del desarrollo es una cuestión que ha sido estudiada anteriormente, de modo que se ha observado que los discos jóvenes que son mitóticamente activos presentan células que se encuentran en todas las fases del ciclo celular. Sin embargo, conforme los discos llegan al final de su desarrollo, en estado de pre-pupa aumenta significativamente el número de células que se encuentran en la fase G2 del ciclo (Neufeld *et al.*, 1998a, Milán *et al.*, 1996). El enriquecimiento de células en fase G2 se puede observar en los discos de ala, pata y halterio, mientras que el disco de ojo y el cerebro presentan pocas células en fase G2 o M, ya que en éstos predomina la fase G1 (Fain y Stevens, 1982). Con estos antecedentes, y considerando la función que hemos propuesto para *Emc* y *Da* como reguladores de la transición G2/M, analizamos si los niveles de *Da* o de su represor *Emc* estaban variando durante el desarrollo. De esta manera, altos niveles de *Da* o bajos niveles de *Emc* podrían estar controlando la parada en G2 que tiene lugar en etapas tardías del desarrollo. Para estudiar esta posibilidad, realizamos experimentos de PCR cuantitativa, en los que estudiamos los niveles de expresión (mediante la cuantificación de los niveles de ARNm) de *emc* y *da* en discos de ala de individuos de genotipo silvestre en distintos estadios del desarrollo: fase de larva 2, fase de larva 3, y fase de pupa temprana (entre 0 y 4h tras la pupación). Utilizamos varios genes normalizadores que no cambiaran su expresión a lo largo del desarrollo del disco de ala. Para ello, realizamos un estudio de los niveles de expresión de

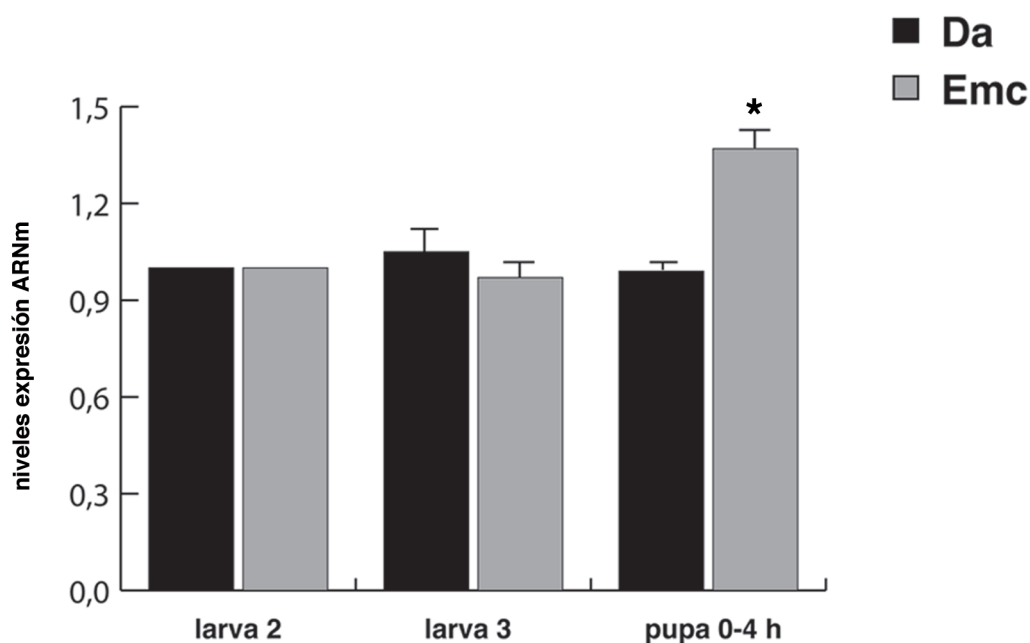


Figura R22: Expresión de *emc* y *da* en el disco imaginal de ala a lo largo del desarrollo. Representación gráfica de la expresión del ARNm de *emc* y *da* durante los estadios de larva 3 y pupa temprana (0-4 h) en discos de ala de genotipo silvestre, respecto a su expresión durante el estadio de larva 2 (al que se otorgó valor 1). La expresión de *emc* aumentó de forma significativa durante el estadio de pupa 0-4 h, mientras que los niveles de *da* no cambiaron en ninguna de las fases estudiadas (n=4, experimentos independientes, *p<0,05).

varios genes: *rpl32*, *rps20*, *αtub84b*, *ef1*, *mnf*, *18s* y *act42A*, descritos por Ponton *et al*, (2011). Los genes escogidos en este estudio como normalizadores por mantener sus niveles de expresión más estables a lo largo del desarrollo en los discos de ala fueron: *rpl32*, *rps20* y *αtub84b*. Los niveles de expresión del ARNm de los genes *da* y *emc* se relativizaron respecto a los niveles que mostraron en estadio de larva 2, al que se le otorgó valor 1. Como se puede observar en la Figura R22, los niveles de expresión de *da* permanecieron sin cambios entre las distintas fases del desarrollo estudiadas. En el caso de *emc*, tampoco se observaron cambios significativos entre los estadios de larva 2 y larva 3, mientras que en las pupas tempranas se observó un aumento significativo de su expresión, que se incrementó un 37%. Este aumento podría indicar diferentes requerimientos de este gen durante la fase pupal, dado que los niveles de *emc* son importantes para regular procesos como la diferenciación de órganos sensoriales. Estos resultados sugieren que el balance de estos genes no parece estar controlando el incremento en fase G2 que se observa al final del desarrollo del disco de ala. Sería necesario realizar otros estudios complementarios para entender a qué se deben los cambios en los niveles de *emc* durante la metamorfosis del ala.

SEGUNDA PARTE: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DE NUEVOS MEDIADORES DE LAS FUNCIONES DE Emc EN EL ALA DE DROSOPHILA. ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL GEN *CG34422*

1. Búsqueda de proteínas que interaccionan con Emc mediante el ensayo de Doble Híbrido de levaduras y confirmación de los resultados obtenidos

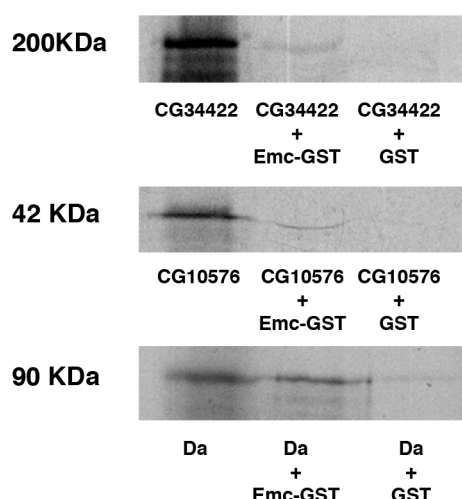
Con el fin de profundizar en el conocimiento de las funciones de *emc*, se desarrolló en el laboratorio una búsqueda de proteínas que interaccionasen físicamente con Emc. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de Doble Híbrido en levaduras para el que utilizamos la región HLH de Emc como “cebo”. Como resultado de estos experimentos, se obtuvo una lista de proteínas que interaccionaron de forma específica con Emc. Entre los factores identificados se encontraron otras proteínas bHLH cuya interacción con Emc ha sido ya descrita previamente, como Daughterless (Da) y Hairy (Alifragis *et al.*, 1997), hecho que validaba el ensayo realizado. Para un primer estudio, en esta Tesis se seleccionaron los interactores 1, 20 y 26, correspondientes a los genes *CG10576*, *CG34422* y *CG9588* respectivamente, cuya función en el desarrollo de *Drosophila* era desconocida (Tabla 1).

En primer lugar, validamos los resultados obtenidos en el ensayo de Doble Híbrido mediante experimentos de inmunoprecipitación. Para ello, analizamos si la proteína recombinante Emc-GST interaccionaba físicamente con proteínas sintetizadas *in vitro* a partir de los ADNc de los interactores seleccionados. Durante la síntesis de estas proteínas utilizamos metionina marcada radiactivamente con S^{35} . Como control positivo utilizamos la bHLH de tipo I Daughterless, cuya unión física con Emc ha sido descrita previamente (Alifragis *et al.*, 1997), mientras que como control negativo se incubaron las proteínas sintetizadas *in vitro* con la proteína recombinante GST, a la cual no debían unirse (Figura R23 A). Los experimentos de inmunoprecipitación demostraron que Emc interacciona con las proteínas *CG10576*, *CG34422* y Da. No pudimos estudiar la posible interacción entre Emc y

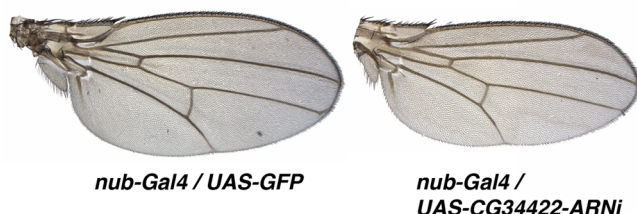
Tabla 1: Resultados ensayo doble híbrido								
nombre clon	Emc	Bcd	Hairy	DmCdc2	Ftz	m8	m3	Info
emc 1	++	-	+	+	-	-	-	CG10576
emc 26	+++	-	-	-	-	-	-	CG9588
emc 20	++	-	+	-	-	-	-	CG34422

Tabla 1: Resultados del ensayo de Doble Híbrido de levaduras. En la tabla se muestran los resultados obtenidos para los interactores emc 1, emc 26 y emc 20, que corresponden a los genes *CG10576*, *CG9588* y *CG34422*, respectivamente. Los signos “+” muestran la intensidad con la que se unieron los interactores a las proteínas Emc, Hairy y Cdc2, mientras que los signos “-” muestran la ausencia de interacción con las proteínas Bicoid, Fushi Tarazu, E(spl) m8 y E(spl) m3.

A



B



C

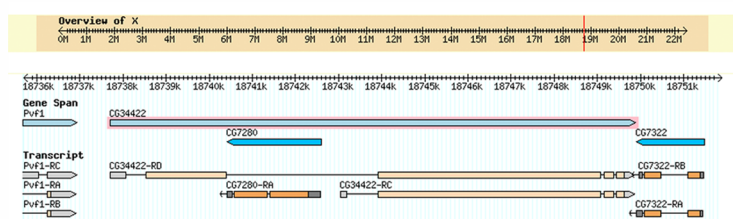


Figura R23: Ensayos de inmunoprecipitación. Estructura del gen *CG34422* y fenotipo de reducción de su expresión en el ala. (A) Ejemplos representativos de los ensayos de inmunoprecipitación que muestran la síntesis *in vitro* de las proteínas CG34422, CG10676 y Daughterless (primera calle de cada gel), su unión a la proteína de fusión Emc-GST (segunda calle de cada gel) y a la proteína GST (tercera calle de cada gel). Las tres proteínas se unieron a Emc-GST en distintos grados, mientras que apenas se unieron a la proteína GST, que se empleó como control negativo en el experimento. **(B)** Alas adultas de genotipo *nub-Gal4 / UAS-GFP* y *nub-Gal4 / UAS-CG34422^{ARNi}*. La expresión del ARNi de *CG34422* ocasionó la reducción del tamaño del ala. **(C)** Imagen obtenida de Flybase en la que se muestra la región genómica que contiene al gen *CG34422*, y sus dos transcritos: *CG34422-RD* y *CG34422-RC*. En la hebra complementaria, se encuentra la secuencia codificante de otro gen, *CG7280*.

la proteína codificada por el gen *CG9588*, ya que no fue posible sintetizarla *in vitro*. Cabe destacar que la síntesis de *CG34422* produjo una proteína incompleta, equivalente a la isoforma *CG34422-RC*, que se puede observar en la Figura R23 C.

Para conocer si los genes seleccionados en el ensayo de Doble Híbrido tenían algún papel durante el desarrollo del ala de *Drosophila*, bloqueamos su función mediante la sobre-expresión de construcciones UAS-ARNi, utilizando la línea *nub-Gal4*. Cuando redujimos la función de los genes *CG10576* y *CG9588*, no observamos ningún efecto en el desarrollo del ala, de manera que el aspecto de las alas adultas mutantes era similar al de las alas control (datos no mostrados). En cambio, la disminución de la expresión del gen *CG34422* (*nub-Gal4/ UAS-CG34422^{ARNi}*) produjo un fenotipo de disminución del tamaño del ala, sin modificación del patrón de venas y órganos sensoriales de la misma (Figura R23 B). Este gen, cuyo fenotipo de reducción de la función compartía características con la falta de función de *emc*, fue escogido para realizar un estudio funcional más detallado.

2. Descripción de las características moleculares y fenotípicas del gen *CG34422*

2.1. Análisis de la homología de secuencia entre el gen *CG34422* y sus ortólogos humanos *arid4a* y *arid4b*

Como se explicó en el apartado 7.1 de la Introducción, el gen ortólogo en humanos asignado a *CG34422* de *Drosophila* es el gen *arid4b* (Flybase), para el que se han descrito diversas funciones en el control de la proliferación. Analizamos el nivel de homología que presentaba el gen *CG34422* con los dos miembros de la familia ARID de humanos. Para ello, realizamos un estudio de homología de secuencia (BLAST, NCBI) entre el gen *CG34422* y los genes *arid*: *arid4a* o *rbp1*, y *arid4b*, también llamado *rbp2* o *bcaa*. Ambos genes presentan una homología de secuencia entre sí del 62%. *Arid4a* presenta una homología con *CG34422* de un 46% mientras que *arid4b* presenta una homología del 51%. Si bien *CG34422* presenta mayores similitudes en su secuencia con *arid4b*, hemos encontrado que la proteína codificada por el gen *CG34422* posee un dominio conservado en su región C-terminal de secuencia LXCXE, que en humanos ha sido descrito como fundamental para la unión física entre ARID4A (Rbp-1) y la proteína Retinoblastoma Factor (Rbf) (Binda *et al.*, 2006; Suryadinata *et al.*, 2011). Este dominio LXCXE está presente en la secuencia de ARID4A, y no en la de ARID4B, de modo que es posible que *CG34422* reúna características moleculares y funcionales de ambos ortólogos, lo que es coherente con que sea el único representante de estos genes en *Drosophila*.

2.2. Expresión de *CG34422* en los tejidos larvarios de *Drosophila*

Para analizar tanto la localización sub-celular de *CG34422* como su patrón de expresión, generamos un anticuerpo policlonal que reconociese específicamente a esta proteína. Para ello, clonamos un fragmento situado en el segundo exón del gen *CG34422* en un vector de expresión que nos permitió generar una proteína recombinante, que se inyectó en cobayas para la producción de anticuerpos (ver Materiales y Métodos y Figura M3). Tinciones inmunohistoquímicas con dicho anticuerpo en discos de ala de tercer estadio de larvas *ap-Gal4-UAS-GFP/UAS-cg34422^{ARNi}* mostraron tanto la especificidad del mismo en reconocer a la proteína *CG34422*, como la efectividad del ARNi de *CG34422*, que eliminó su expresión de forma eficiente (Figura R25 H-H’').

En la Figura R24 se muestra el patrón de expresión de *CG34422* en diferentes tejidos larvarios de *Drosophila*. Podemos observar que la proteína *CG34422* se expresa de forma ubicua en todos los núcleos de las células de los discos imaginales (Figura R24 A-C y A’-C’). En las glándulas salivares observamos que, si bien la tinción con el anticuerpo es eminentemente nuclear, también se puede apreciar tinción en el citoplasma y las membranas celulares (Figura R24 D-D’). En el sistema nervioso central observamos que *CG34422* parece expresarse en todas las células tanto en los lóbulos cerebrales, como en la cuerda nerviosa ventral (Figura R24 E-F y E’-F’), si bien dada la complejidad de tipos celulares que presenta este tejido, sería necesario realizar co-tinciones con marcadores celulares específicos para poder realizar esta afirmación.

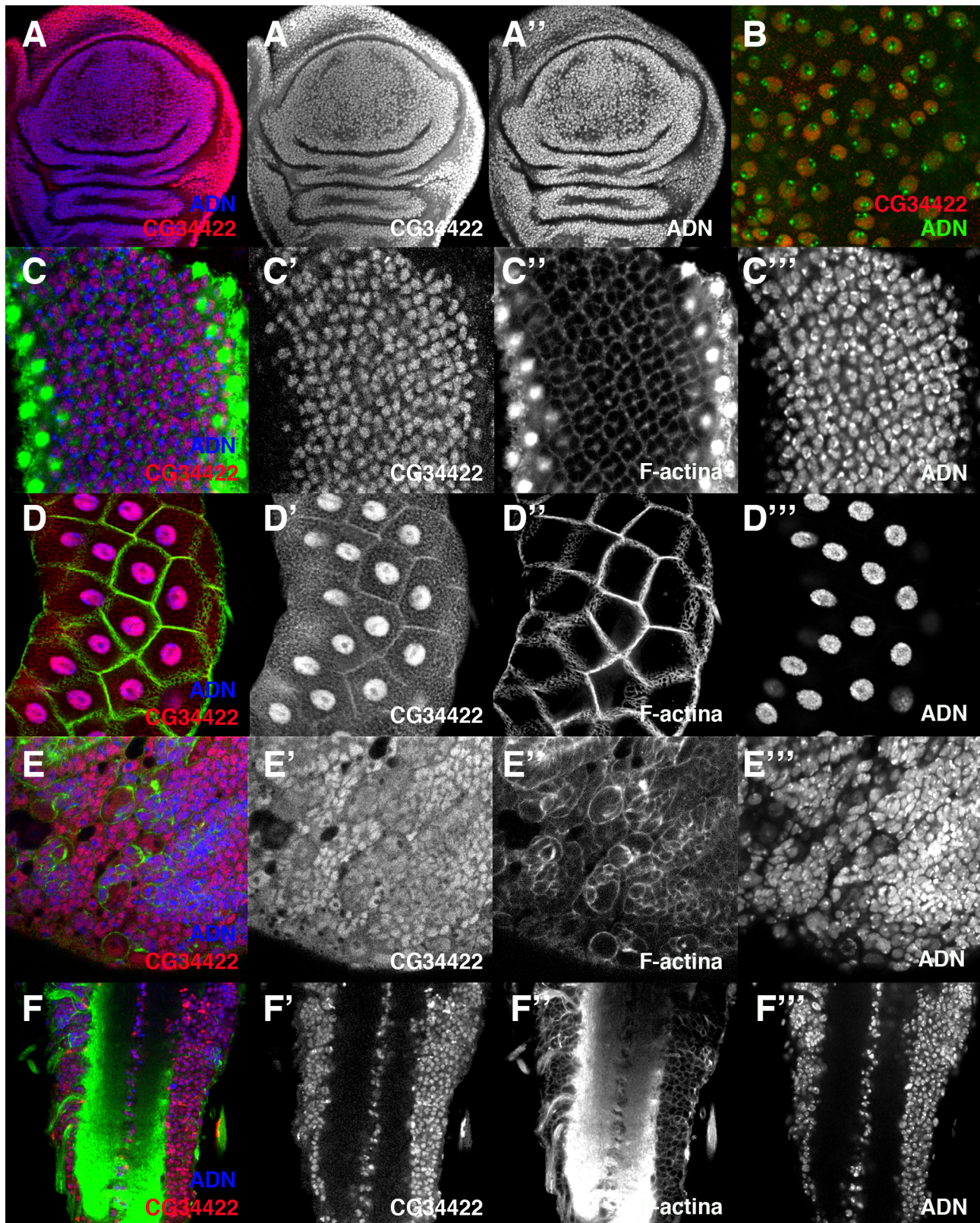


Figura R24: Expresión de CG34422 en los tejidos larvarios de *Drosophila*. (A, B) Expresión de CG34422 en el epitelio columnar (A) y en la membrana peripodial (a mayor aumento, B) del disco imaginal de ala (en rojo en A y B, y en gris en A') y tinción con el marcador de ADN Topro (en azul en A, en verde en B y en gris en A'). (C) Expresión de CG34422 en el disco imaginal de ojo (en rojo en C y en gris en C') y tinción con el marcador de ADN Topro (en azul en C y en gris en C'') y con Faloidina (en verde en C y en gris en C''), que marca las membranas celulares. (D) Expresión de CG34422 en las glándulas salivares (en rojo en D y en gris en D') teñidas además con Topro (en azul en D y en gris en D'') y con Faloidina (en verde en D y en gris en D'). (E, F) Expresión del CG34422 en los lóbulos cerebrales (E) y la cuerda nerviosa ventral (F) (en rojo en E, F y en gris en E', F'). Los cerebros se tiñeron además con Topro (en azul en E, F y en gris en E''' y F''') y Faloidina (en verde en E, D y en gris en E'' y F'').

2.3. Análisis del fenotipo de disminución de la expresión del gen *CG34422*

Como hemos comentado en el apartado 1, la disminución de la expresión del gen *CG34422* en el ala de *Drosophila* causa un fenotipo de disminución de tamaño de la misma, sin alterar el patrón de venas. Para profundizar en este análisis, usamos dos ARNi dirigidos contra distintas regiones de la secuencia de *CG34422*, el *UAS-CG34422-Nt^{ARNi}*, dirigido contra primer exón del gen y el *UAS-CG34422-Ct^{ARNi}*, dirigido contra el segundo exón. Ambos produjeron el mismo fenotipo de reducción de tamaño, pero en distintos grados. El *UAS-CG34422-Ct^{ARNi}* expresado bajo el control de la línea *ap-Gal4* a 25° C (*ap-Gal4/ UAS-CG34422-Ct^{ARNi}*) produjo una disminución de tamaño del ala de un 22% respecto al ala control *ap-Gal4* (Figura R25 B, comparar con A). Estas alas presentaban un aspecto de ala curvada, debido a que la parte dorsal era más pequeña que la ventral, lo cual provoca que las alas se curven hacia el lado dorsal. El *UAS-CG34422-Nt^{ARNi}* expresado de la misma forma (*ap-Gal4/ UAS-CG34422-Nt^{ARNi}*) produjo una disminución del tamaño del ala de un 16% respecto al ala control (Figura R25 C, comparar con A). Cuando co-expresamos ambos ARNi (*ap-Gal4 UAS-CG34422-Ct^{ARNi}/ UAS-CG34422-Nt^{ARNi}*) obtuvimos alas que fueron un 32% más pequeñas que las controles, por lo tanto más pequeñas que al expresar cada ARNi por separado (Figura R25 D, comparar con A, B y C). Este incremento del fenotipo de reducción del tamaño del ala producido al co-expresar ambos ARNi probablemente se debe a que ninguna de las construcciones expresadas individualmente logra una reducción completa de la función del gen.

Como hemos mostrado, el gen *CG34422* tiene dos isoformas (Figura R23 C), de modo que el ARNi dirigido contra la región Nt sólo reduce la expresión de la isoforma *CG34422-RD*, mientras que el ARNi contra la región Ct reduciría ambas isoformas. Por ello, decidimos emplear esta última construcción para un análisis más detallado de la función del gen *CG34422*.

La sobre-expresión del ARNi-Ct bajo el control de *en-Gal4* (*en-Gal4/ UAS-CG34422^{ARNi}*), ocasionó una reducción del tamaño del compartimento posterior del ala de un 10% (Figura R25 F, comparar con E). Cuando combinamos esta construcción con una deficiencia génica que cubría la región citogenética 17C1-17F1, que contiene al gen *CG34422* (*Df 17C1-17F1/ +; en-Gal4 UAS-CG34422^{ARNi}*), la reducción del tamaño del ala se incrementó hasta un 20% (Figura R25 G, comparar con E). Este resultado confirma que la sobre-expresión del ARNi del gen *CG34422* se comporta como una condición hipomorfa.

2.4. Análisis del fenotipo de sobre-expresión del gen *CG34422*

Las anotaciones acerca de la estructura y la secuencia del gen *CG34422* han sufrido constantes modificaciones en los últimos años. Actualmente, las bases de datos muestran que este gen produce dos transcritos: uno largo de 8079 pb (transcrito RD), que incluye todos los exones del gen, y uno más corto de 5984 pb (transcrito RC), que excluye el primer exón del gen (Figura R26 A). Previamente se describió otro transcrito (transcrito B), que estaba codificado por una parte del primer exón del gen y que actualmente no aparece descrito en las bases de datos (Flybase, NCBI, Ensembl).

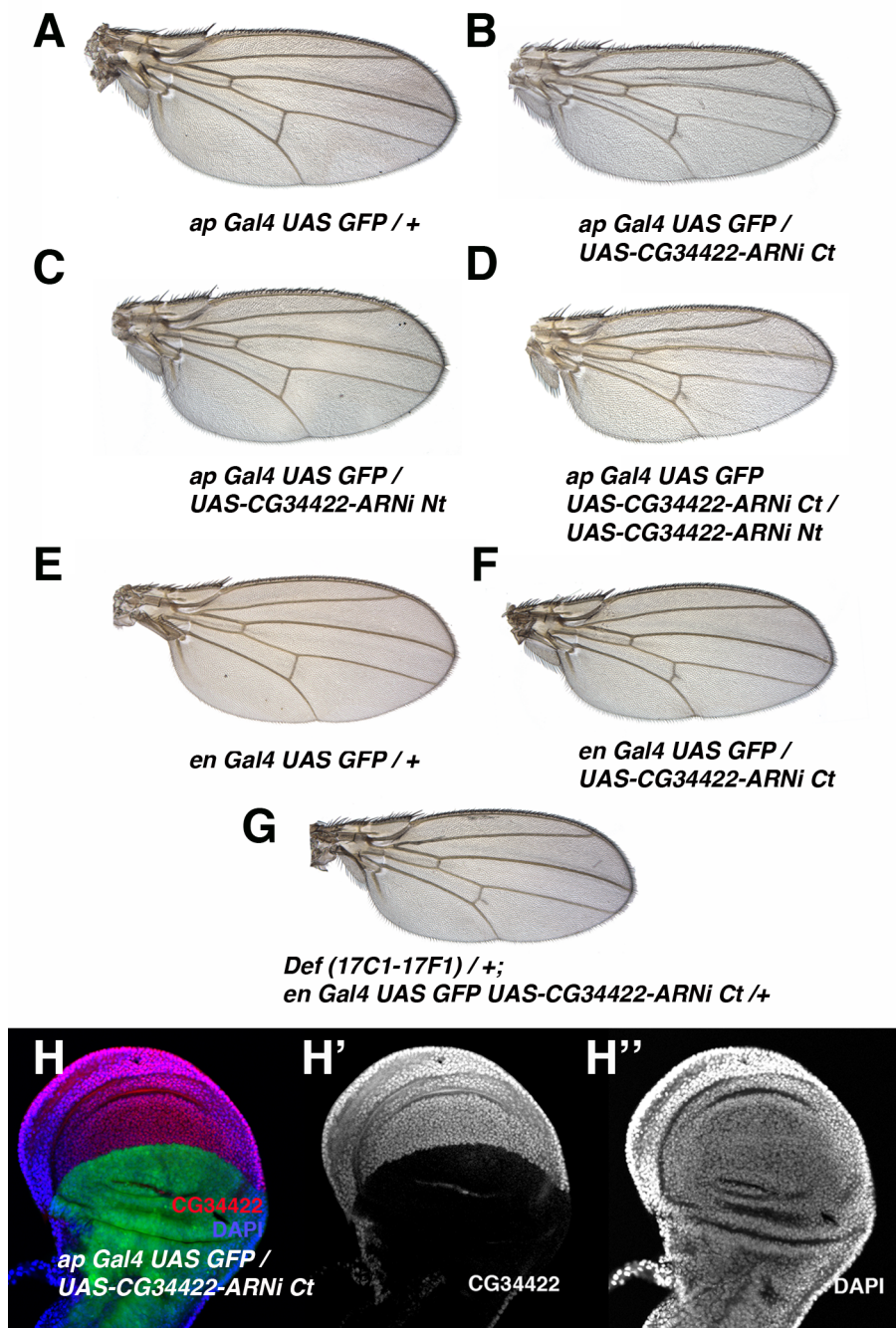


Figura R25: Efectos de la disminución de la expresión del gen *CG34422* en el ala. (A-D) Alas adultas de genotipo *ap-Gal4 UAS-GFP/+* (A), *ap-Gal4 UAS-GFP/ UAS-CG34422-Ct^{ARNi}* (B), *ap-Gal4 UAS-GFP/ UAS-CG34422-Nt^{ARNi}* (C) y *ap-Gal4 UAS-GFP UAS-CG34422-Ct^{ARNi}/ UAS-CG34422-Nt^{ARNi}* (D). La combinación de los ARNi Nt y Ct dió lugar a alas de tamaño más reducido que las originadas por la expresión individual de ambos ARNi (comparar D con B y C). **(E-G)** Alas adultas de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/ +* (E), *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-CG34422-Ct^{ARNi}* (F) y *Df(1) 17C1-17F1/ +; en-Gal4 UAS-GFP UAS-CG34422-Ct^{ARNi}/ +* (G). La combinación del ARNi del CG34422 con la deficiencia de la región citogenética 17C1-17F1 dió lugar a alas con un compartimento posterior más reducido que las originadas por la expresión del ARNi (comparar G con F). **(H)** Expresión de CG34422 (en rojo en H y en gris en H') en discos de ala de tercer estadio de genotipo *ap-Gal4 UAS-GFP/ UAS-CG34422-Ct^{ARNi}*. Los discos se tiñeron también con el marcador nuclear DAPI (en azul en H y en gris en H''). La expresión de CG34422 se vio fuertemente reducida en el compartimento dorsal.

Para analizar el fenotipo de sobre-expresión del gen *CG34422*, nos propusimos realizar una construcción UAS que contuviese la secuencia completa del gen. Sin embargo no nos fue posible clonarla, ya que las librerías de ADNc sólo contienen el fragmento correspondiente al transcrito RC. Tampoco conseguimos su amplificación a partir de ADN genómico o ADNc obtenido en nuestro laboratorio a partir de moscas de genotipo silvestre. Así pues, construimos dos formas truncadas del gen *CG34422*: la construcción *pUAS-CG34422-Nt-flag* que contiene la parte codificante del primer exón (extremo N-terminal, antiguo transcrito B), que amplificamos a partir de ADN genómico (Figura M3 en azul, y R26 A), y la construcción *pUAS-CG34422-Ct-flag* (extremo C-terminal) que contiene la secuencia correspondiente al transcrito RC y que amplificamos a partir de una librería de ADNc (Figura M3 en verde, y R26 A). El fragmento Nt contiene las secuencias conservadas descritas en el apartado 2.1 y el fragmento Ct contiene el dominio proteico LXCXE, necesario en la proteína de vertebrados ARID4A para unirse al Factor del Retinoblastoma.

La sobre-expresión de la construcción *CG34422-Nt* en el ala con distintas líneas *Gal4* (*sal^{EPV}-Gal4*, *nub-Gal4*, *ap-Gal4*, *en-Gal4*) dio lugar a un fenotipo de disminución del tamaño del ala (Figura R26 C, H, K y N comparar con los controles en B, G, J y M). En algunas ocasiones, observamos la ausencia parcial de la vena 5 (Figura R26 H). Este fenotipo fue similar al observado al disminuir la expresión del gen, pero más fuerte (ver Figura R23 y R25). La sobre-expresión de la construcción *CG34422-Ct* con la línea *sal^{EPV}-Gal4* (*sal^{EPV}-Gal4/ UAS-CG34422-Ct*) dio lugar a una reducción del tamaño del ala más fuerte que la observada con la sobre-expresión del fragmento Nt (Figura R26 D, comparar con B). En los machos, además observamos la eliminación de la vena 2, y la presencia frecuente de muescas en el extremo distal del ala (Figura R27 H). Cuando sobre-expresamos la construcción *CG34422-Ct* con la línea *nub-Gal4* (*nub-Gal4/ UAS-CG34422-Ct*) observamos alas extremadamente pequeñas en las que se puede apreciar la desaparición parcial de algunas venas (Figura R26 I, comparar con G). La sobre-expresión de la construcción *CG34422-Ct* con las líneas *ap-Gal4* y *en-Gal4* presentó letalidad en fase larvaria temprana, por lo que no pudimos analizar el fenotipo de las alas adultas (Figura R26 L y Ñ).

Por lo tanto, podemos concluir que la sobre-expresión de cada uno de los fragmentos truncados de *CG34422* da lugar a un fenotipo similar al observado al reducir la expresión del gen, pero más extremo, siendo la sobre-expresión del fragmento Ct más severa que la del fragmento Nt.

Los fenotipos de sobre-expresión de estas dos formas truncadas podrían deberse a una reducción de la actividad de la proteína, si éstas se comportasen como formas dominantes negativas. Para testar esta hipótesis, sobre-expresamos ambas formas truncadas de las proteínas en un fondo heterocigótico para una deficiencia que incluye al gen *CG34422* (*Df 17C1-17F1*). Si la sobre-expresión de alguna de las formas truncadas que hemos analizado diera lugar a un efecto dominante negativo, al reducir la dosis del gen esperaríamos observar un incremento de los fenotipos producidos por la sobre-expresión de estas líneas. Encontramos que, mientras que la sobre-expresión del fragmento *CG34422-Nt* en el compartimento posterior (*en-Gal4 UAS-CG34422-Nt*) redujo el tamaño del compartimento mutante en un 22,5% respecto al control (Figura R26 N, comparar con M), la sobre-expresión de esta forma truncada en moscas que además eran mutantes para la deficiencia (*Df*

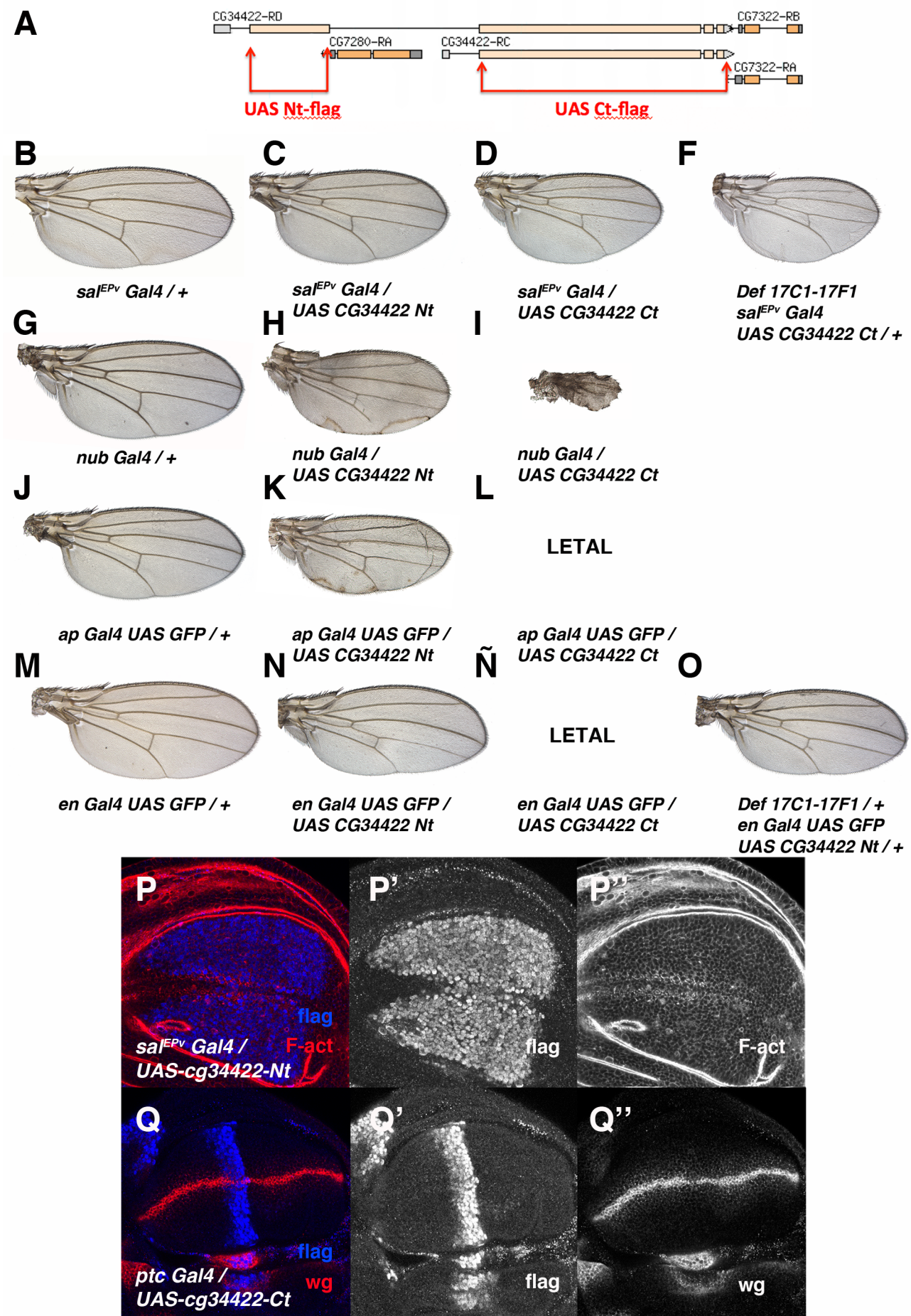


Figura R26: Efectos de la sobre-expresión del gen *CG34422* en el ala. (A) Esquema de los dos transcritos a los que da lugar el gen *CG34422*: *CG34422-RD* y *CG34422-RC*. Las flechas rojas señalan las regiones clonadas en las dos construcciones de sobre-expresión que se generaron. **(B-D, G-Ñ)** Alas adultas que muestran el fenotipo de sobre-expresión del fragmento Nt (*UAS-CG34422-Nt*) y del fragmento Ct (*UAS-CG34422-Ct*), con las líneas *sal^{EPV}-Gal4* (comparar C y D con el control en B), *nub-Gal4* (comparar H e I con el control en G), *ap-Gal4* (comparar K y L con el control en J) y *en-Gal4* (comparar N y Ñ con el control en M). La combinación de las construcciones Nt y Ct con cualquiera de las líneas *Gal4* utilizadas dio lugar a la reducción del tamaño del ala en el lugar de expresión. **(F, O)** Alas adultas de genotipo *Df (1) 17C1-17F1/ +; sal^{EPV}-Gal4 UAS-CG34422-Ct/ +* (F), y *Df (1) 17C1-17F1/ +; en-Gal4 UAS-CG34422-Nt/ +* (O). La combinación de la sobre-expresión de los fragmentos Nt y Ct con la deficiencia de la región citogenética 17C1-17F1 dio lugar a una reducción mayor del tamaño del ala que la observada al sobre-expresar cada fragmento por sí solo (comparar F con D, y O con N). **(P, Q)** Discos de ala de tercer estadio larvario de genotipo *sal^{EPV}-Gal4 / UAS-CG34422-Nt* (P) y *patched-Gal4 (ptc-Gal4)/ UAS-CG34422-Nt* (Q). La expresión de la proteína Flag se muestra en azul en P y Q y en gris en P' y Q'. Los discos muestran además la expresión de F-actina (en rojo en P y en gris en P'') y de Wg (en rojo en Q y en gris en Q'').

17C1-17F1/ +; en-Gal4 UAS-CG34422-Nt), causaba una reducción del compartimento posterior de un 25,2% (Figura R26 O, comparar con M). De manera similar, observamos que la sobre-expresión del fragmento Ct con la línea *sal^{EPV}-Gal4* (*sal^{EPV}-Gal4 UAS-CG34422-Ct*) produjo una reducción del tamaño del ala de un 34,1% respecto al control (Figura R26 D, comparar con B), mientras que las alas que además eran mutantes para la deficiencia (*Df 17C1-17F1/ +; sal^{EPV}-Gal4 UAS-CG34422-Ct*) eran un 39,9% más pequeñas (Figura R26 F, comparar con B). Si bien las diferencias no fueron muy fuertes, sí que se observa una tendencia a que los fenotipos producidos por la sobre-expresión de las formas truncadas del gen *CG34422* se potencien en combinación con la deficiencia del gen. Estos datos sugieren que ambas formas truncadas *CG34422-Nt* y *CG34422-Ct* podrían comportarse como formas dominante negativas, si bien será necesario realizar experimentos complementarios para confirmar esta hipótesis.

Como hemos comentado al principio de este apartado, las construcciones *UAS-CG34422-Nt* y *UAS-CG34422-Ct* contenían la secuencia “Flag” fusionada a cada fragmento del gen. Para comprobar que las distintas construcciones truncadas que hemos utilizado en este estudio se expresaban a altos niveles, analizamos la expresión de esta proteína marcadora en discos *sal^{EPV}-Gal4/ UAS-CG34422-Nt* (Figura R26 P-P') y *patched-Gal4/ UAS-CG34422-Ct* (Figura R26, Q-Q'). Ambas mostraron un incremento de la expresión de las proteínas quiméricas, que se localizaron en el núcleo de las células.

3. Estudio de la función del gen *CG34422* en el control de la proliferación y la muerte celular

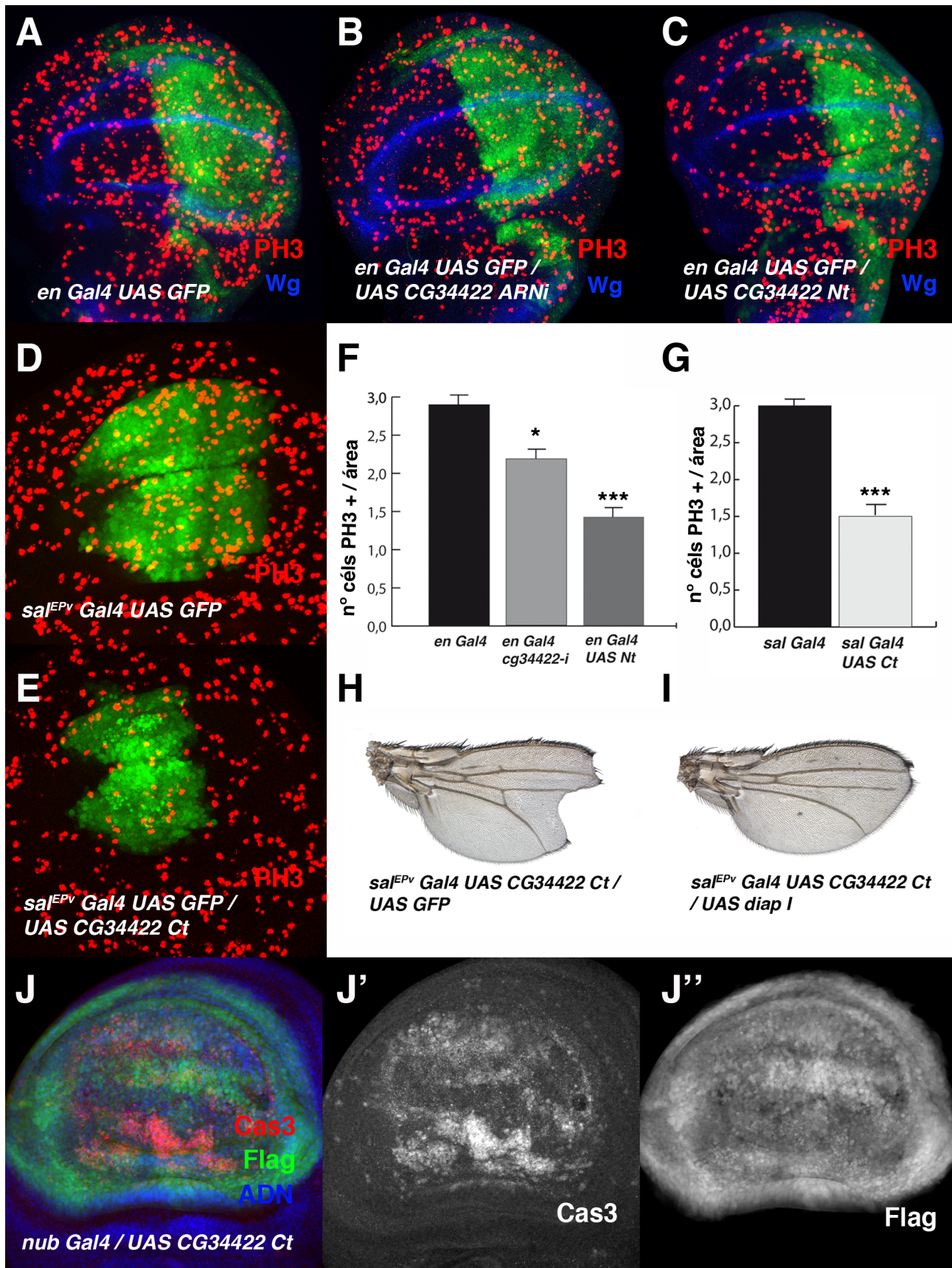
Como hemos descrito anteriormente, tanto la disminución de la expresión del gen *CG34422* como la sobre-expresión de las formas truncadas Nt y Ct producen una disminución del tamaño del ala. A continuación, analizamos si esta reducción de tamaño podía deberse a una disminución del número de células en división durante el desarrollo del disco, o bien a un aumento de la muerte celular en los mismos. En primer lugar, calculamos el índice mitótico en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario en los que habíamos bloqueado la expresión del gen *CG34422* en el compartimento posterior del disco mediante la expresión de *UAS-CG34422^{ARNi} (en-Gal4 UAS-GFP/*

UAS-CG34422^{ARNi}). Encontramos que en el compartimento posterior de estos discos se producía una reducción significativa del número de células en mitosis ($2,18 \pm 0,19$, Figura R27 B, frente a $2,9 \pm 0,14$ en el control *en-Gal4 UAS-GFP*, Figura R27 A, representado en F). La sobre-expresión de la forma truncada *CG34422-Nt* bajo el control de *en-Gal4* también redujo de forma significativa el índice mitótico en el compartimento posterior de estos discos ($1,38 \pm 0,1$ frente a $2,9 \pm 0,14$ en el control *en-Gal4 UAS-GFP*, Figura R27 C, representado en F). De la misma manera, cuando sobre-expresamos la forma *CG34422-Ct* con la línea *sal^{EPV}-Gal4*, observamos que el dominio de expresión de *sal^{EPV}* se encontraba fuertemente reducido en tamaño (Figura R27 E, comparar con D). Además, encontramos que existía una fuerte reducción del número de células en mitosis en esa región ($1,5 \pm 0,07$ frente a $3 \pm 0,14$ en el control *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP*, Figura R27 D-E, representado en Figura R27 G).

Para evaluar la contribución de la muerte celular a los fenotipos ocasionados por la disminución o el aumento de la expresión del gen *CG34422*, analizamos con el anticuerpo anti-Caspasa 3 (Cas3) la presencia de células apoptóticas en discos de ala de tercer estadio en los que alteramos la función de este gen. No observamos incremento en la expresión de Cas3 ni al disminuir la expresión del gen *CG34422* con el ARNi (*en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-CG34422^{ARNi}*), ni al sobre-expresar la forma truncada *CG34422-Nt* (*en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-CG34422-Nt*) (datos no mostrados). En cambio, la sobre-expresión de la forma *CG34422-Ct* produjo un marcado aumento de células apoptóticas en el dominio donde fue expresado, como se puede observar en los discos *nub-Gal4/ UAS-CG34422-Ct* (Figura R27 J-J'). Para evaluar si el fenotipo producido por la sobre-expresión del fragmento *CG34422-Ct* se debía a este incremento de apoptosis, bloqueamos la muerte celular co-expresando esta forma truncada junto con el inhibidor de apoptosis *diap I*. Como hemos mencionado previamente, las alas de moscas adultas de genotipo *sal^{EPV}-Gal4 UAS-CG34422-Ct* presentaban un tamaño reducido, así como la desaparición de la vena 2 y la presencia de grandes muescas en la región distal del borde del ala (Figura R27 H). La co-expresión de *diap I* junto con la forma *CG34422-Ct* en el dominio *sal^{EPV}*

Figura R27: Cambios originados por la variación de los niveles del gen *CG34422* sobre la proliferación y la muerte celular. (A-C, F) Discos de ala de tercer estadio larvario de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/ +* (A), *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-CG34422^{ARNi}* (B) y *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-CG34422-Nt* (C), marcados con PH3 (en rojo) y Wg (en azul) . (F) Representación gráfica del índice mitótico dentro del área del compartimento P del ala delimitado por la expresión de Wg, de los genotipos mostrados en A-C. Tanto la reducción de la función de *CG34422* (*UAS-CG34422^{ARNi}*) (B) como la sobre-expresión del fragmento Nt (*UAS-CG34422-Nt*) (C) redujeron el número de divisiones con respecto al control *en-Gal4 UAS-GFP*, $n=10$ discos por genotipo, $*p<0,05$ y $***p<0,001$. **(D, E, G)** Discos de ala de tercer estadio larvario de genotipo *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ +* (D), y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP/ UAS-CG34422-Ct* (E), marcados con PH3 (en rojo). La sobre-expresión del fragmento Ct redujo el tamaño de la región *sal^{EPV}* (visualizada con *UAS-GFP* en verde, comparar E con el control en D). (G) Representación gráfica del índice mitótico de los genotipos mostrados en D y E. La sobre-expresión del fragmento Ct (*UAS-CG34422-Ct*, E) provocó una disminución del número de divisiones respecto al control *sal^{EPV}-Gal4 UAS-GFP*, $n=10$, $***p<0,001$. **(H, I)** Alas de machos de genotipo *sal^{EPV}-Gal4 UAS-CG34422-Ct/ UAS-GFP* (H) y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-CG34422-Ct/ UAS-diap I* (I). La sobre-expresión del inhibidor de la muerte celular *diap I* eliminó las muescas de la parte distal de las alas, pero no produjo un rescate del tamaño del ala. **(J-J'')** Discos de ala de tercer estadio larvario de genotipo *nub-Gal4/ UAS-CG34422-Ct* que muestran la expresión de Cas 3 (en rojo en J y en gris en J') y Flag (en verde en J y en gris en J''). Los núcleos se muestran en azul (J).

(*sal^{EPV}-Gal4 UAS-CG34422-Ct/UAS-diap I*) suprimió las muescas en el margen del ala, pero no rescató de forma significativa el pequeño tamaño de estas alas (Figura R27 I, comparar con H).



Como conclusión, podemos decir que tanto la disminución de la función del gen *CG34422*, mediante la expresión de *CG34422^{ARNi}*, como la sobre-expresión de los fragmentos *CG34422-Nt* y *CG34422-Ct*, dan lugar a una reducción significativa del número de células en mitosis en el disco de ala, lo que podría explicar el fenotipo de reducción del tamaño del ala adulta que ocasionan. La sobre-expresión del fragmento *CG34422-Ct* además ocasionó la aparición de células apoptóticas en el disco de ala, si bien esta circunstancia sólo contribuye parcialmente al fenotipo de reducción de tamaño de ala.

4. Estudio de la interacción de *CG34422* con genes reguladores del ciclo celular

Trabajos previos (ver Introducción) han demostrado que la proteína Sin3A interacciona físicamente con el producto del gen *CG34422* (Swaminathan y Pile, 2010). Estos trabajos han mostrado que Sin3A regula positivamente la expresión de *string*, de modo que la sobre-expresión de *stg* es suficiente para rescatar el fenotipo de disminución del tamaño del ala que ocasiona la reducción de la expresión de *sin3A* (Swaminathan y Pile, 2010). Dado que la reducción de la función del gen *CG34422* causa un fenotipo muy similar al ocasionado cuando se bloquea la función del gen *sin3A*, analizamos si el fenotipo de falta de función de *CG34422* se debía a un déficit en los niveles de *stg*. Para ello, sobre-expresamos *stg* en condiciones de disminución de la función del gen *CG34422* (*ap-Gal4 UAS-CG34422^{ARNi} / UAS-stg*). Nuestros resultados muestran que la sobre-expresión de *stg* no rescató el fenotipo causado por la reducción de *CG34422* (Figura R28 B, comparar con A).

En células humanas se ha descrito que la proteína Sin3A forma un complejo con la deacetilasa Rpd3. Este complejo promueve la deacetilación y por tanto la represión del gen *E2F*, esencial para la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular (Binda *et al.*, 2006). En *Drosophila* no se ha descrito si esta función del complejo Sin3A está conservada, si bien teniendo en cuenta que Sin3A y *CG34422* interaccionan molecularmente, es posible que una insuficiencia de *CG34422* pudiera alterar la actividad del complejo Sin3A/Rpd3 afectando así a la expresión de E2F. Para estudiar esta posibilidad, analizamos si los niveles de expresión de un reportero de la actividad de E2F (PCNA-GFP) (Lee y Orr-Weaver, 2003) se alteraban al reducir la función de *CG34422*. En discos de ala control se puede observar que la expresión de PCNA presenta niveles similares en los compartimentos anterior y posterior (Figura R28 C, C' y C''). Sin embargo, observamos que cuando redujimos la función de *CG34422* en el compartimento posterior del disco, mediante la expresión de *UAS-CG34422^{ARNi}* bajo el control de *en-Gal4*, se produjo un incremento leve de la expresión de PCNA-GFP en el compartimento mutante (Figura 28 D, D' y D''). Este resultado es sorprendente, ya que sugiere que la actividad del E2F podría encontrarse incrementada en esta condición mutante, mientras que los datos presentados hasta el momento indican que la reducción de la función del gen *CG34422* disminuye la proliferación en el disco de ala. Aún no entendemos las razones de este resultado y serán necesarios experimentos adicionales para elucidar a qué se debe este efecto, aunque existen distintas posibilidades que podrían explicarlo (ver Discusión).

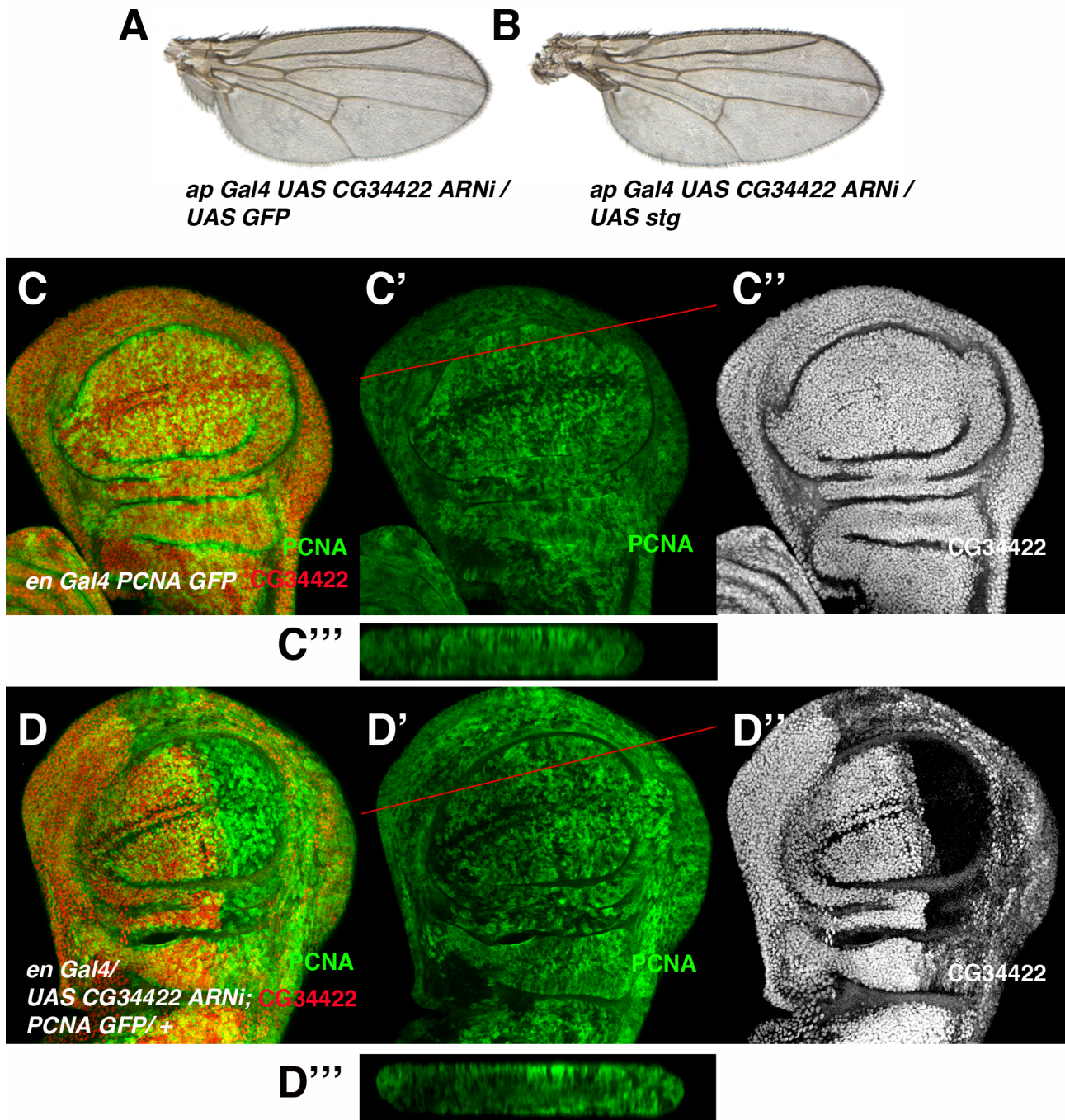


Figura R28: Estudio de las interacciones entre CG34422 y genes reguladores del ciclo celular. (A, B) Alas adultas de genotipo *ap-Gal4 UAS-CG34422^{ARNi} / UAS-GFP* (A) y *ap-Gal4 UAS-CG34422^{ARNi} / UAS-stg* (B). La sobre-expresión de *stg* no rescató la disminución de tamaño de las alas que expresaban el ARNi de CG34422. (C, D) Discos de ala de tercer estadio larvario de genotipo *en-Gal4 / + PCNA-GFP / +* (C) y *en-Gal4 UAS-CG34422^{ARNi}; PCNA-GFP / +* (D) teñidos con anti-CG34422 (en rojo en C, y D y en gris en C'' y D'') y anti-GFP que marca la expresión de PCNA (en verde en C, C', C''' y D, D', D'''). Las figuras C''' y D''' muestran cortes transversales realizados en la región indicada por la línea roja en C' y D'. La reducción de la expresión de CG34422 produjo un aumento leve de los niveles de PCNA en el compartimento posterior del disco.

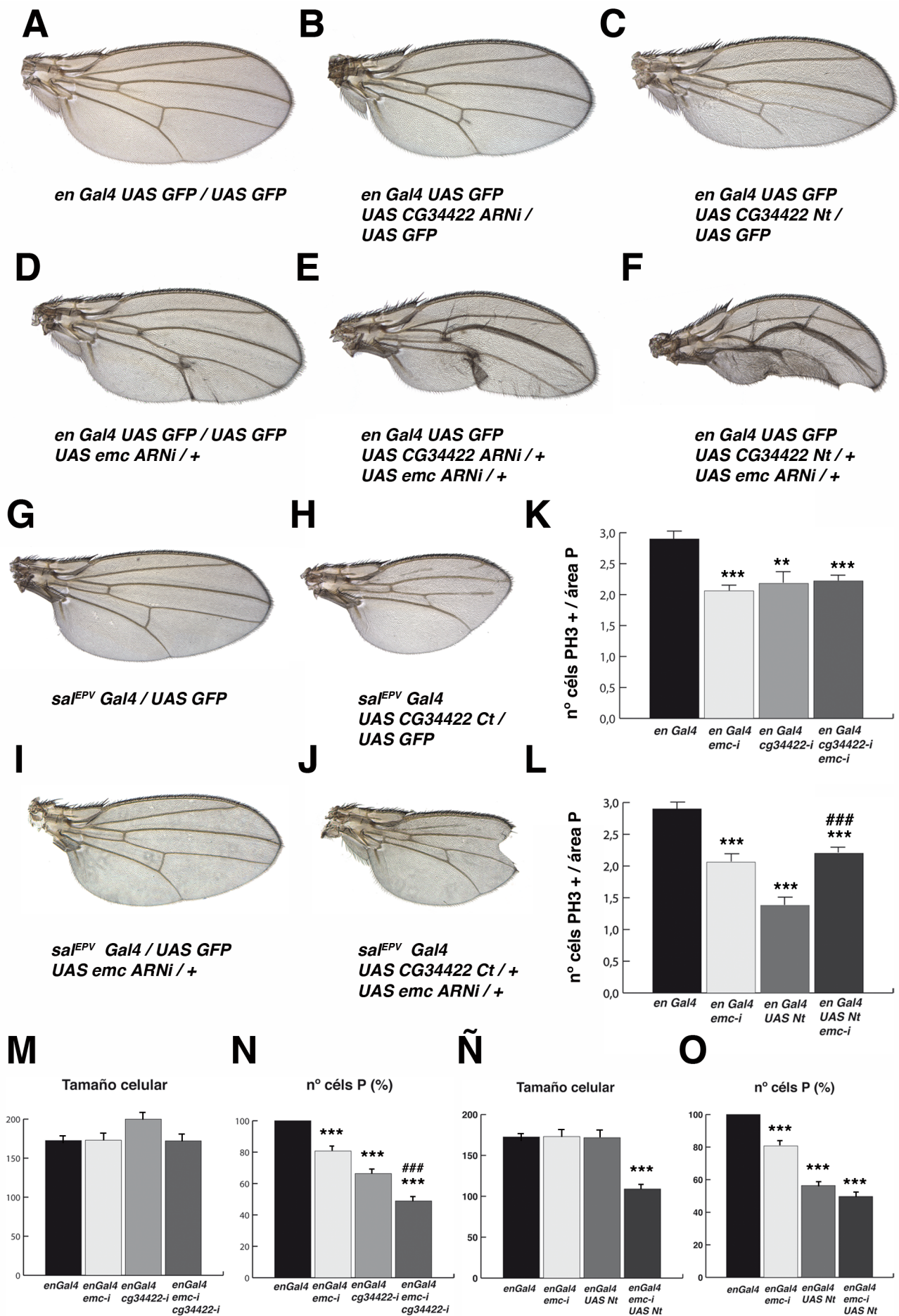


Figura R29: Interacciones genéticas entre el gen *CG34422* y *emc*. (A-F) Alas adultas de genotipos *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP* (A), *en-Gal4 UAS-GFP UAS-CG34422^{ARNi}/ UAS-GFP* (B), *en-Gal4 UAS-GFP UAS-CG34422-Nt/ UAS-GFP* (C), *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP; UAS-emc^{ARNi}/ +* (D), *en-Gal4 UAS-GFP UAS-CG34422^{ARNi}/ +; UAS-emc^{ARNi}/ +* (E), *en-Gal4 UAS-GFP UAS-CG34422-Nt/ +; UAS-emc^{ARNi}/ +* (F). La expresión conjunta de los ARNi de *emc* y *CG34422* dio lugar a alas con el compartimento posterior más pequeño que las alas que expresaron los ARNi individualmente (comparar E con B y D). La combinación de la sobre-expresión de la forma truncada Nt con el ARNi de *emc* produjo alas con el compartimento posterior muy reducido (comparar F con C y D). (G-J) Alas adultas de genotipos *sal^{EPV}-Gal4/ UAS-GFP* (G), *sal^{EPV}-Gal4 UAS-CG34422-Ct/ UAS-GFP* (H), *sal^{EPV}-Gal4/ UAS-GFP; UAS-emc^{ARNi}/ +* (I), y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-CG34422-Ct/ +; UAS-emc^{ARNi}/ +* (J). La combinación de la sobre-expresión de la forma truncada Ct con el ARNi de *emc* produjo alas de menor tamaño que la expresión de ambos por separado, con muescas en la región distal (comparar J con H e I). (K, L) Representación gráfica del índice mitótico de discos de tercer estadio larvario de los genotipos ilustrados en A, D, B y E (K) y de los genotipos en A, D, C y F (L). La expresión conjunta de los ARNi de *emc* y de *CG34422* no disminuyó el número de divisiones por encima de lo observado para ambos ARNi por separado (K, n=10; **p-valor<0,01, ***p-valor<0,001 respecto al control *en-Gal4 UAS-GFP*). La combinación de la sobre-expresión de la región Nt con el ARNi de *emc* produjo un aumento del número de mitosis (L, n=10, ***p-valor<0,001 respecto al control *en-Gal4 UAS-GFP* y ###p-valor<0,001 respecto a *en-Gal4 UAS-GFP UAS-CG34422-Nt*). (M, N) Tamaño de las células del compartimento posterior (M), y número de células de dicho compartimento (N) (en % respecto al control *en-Gal4*) encontrados en las interacciones genéticas realizadas entre el ARNi de *CG34422* y el ARNi de *emc* (correspondientes a las alas en A, D, B y E). La combinación de ambos ARNi no cambió el tamaño celular, pero sí produjo un descenso en el número de células del compartimento (***p-valor<0,001 respecto al control *en-Gal4 UAS-GFP*, ###p-valor<0,001 respecto a *en-Gal4 UAS-GFP UAS-CG34422^{ARNi}*). (Ñ, O) Tamaño de las células del compartimento posterior (Ñ), y número de células de este compartimento (O) (en % respecto al control *en-Gal4*) resultado de las interacciones genéticas entre la sobre-expresión del fragmento Nt de *CG34422* y el ARNi de *emc* (correspondientes a las alas en A, D, C y F). La sobre-expresión de la forma Nt combinada con la reducción de *emc* produjo un fuerte descenso del tamaño celular (***p-valor<0,001 respecto al control *en-Gal4 UAS-GFP*).

5. Análisis de los fenotipos resultantes de la interacción genética entre el gen *CG34422* y *emc*

Para estudiar si la interacción física encontrada entre *Emc* y el *CG34422* tenía una relevancia funcional, analizamos las posibles interacciones genéticas entre ambos genes. Como se describió en la primera parte de esta Tesis, la disminución de los niveles de *emc* en el compartimento posterior de ala mediante la expresión de su ARNi, ocasiona la disminución del área de este compartimento y el acercamiento de las venas 4 y 5 (Figura R29 D), debido a un descenso en el número de células (Figura R29 N, O). Por otro lado, la disminución de los niveles de *CG34422* (*en-Gal4 UAS-CG34422^{ARNi}*) produce una disminución del área del compartimento posterior (Figura R29 B), debido también a una disminución en el número de células que lo componen (Figura R29 N). Cuando se co-expresaron en el compartimento posterior de los discos los ARNi dirigidos contra ambos genes (*en-Gal4 UAS-CG34422^{ARNi}; UAS-emc^{ARNi}*) obtuvimos alas menores que las producidas por la reducción de la función de cualquiera de los dos genes por separado (Figura R29 E, comparar con D y B). Este fenotipo se debió a un descenso en el número de células (Figura R29 N).

La sobre-expresión de la forma truncada *CG34422-Nt* en el compartimento posterior del disco de ala, dio lugar a alas que presentaban una reducción del área del compartimento mutante, como consecuencia de una disminución del número de células (Figura R29 C y O). Cuando se combinó la falta de función de *emc* con la sobre-expresión de esta forma truncada *CG34422-Nt* (*en-Gal4 UAS-CG34422-Nt; UAS-emc^{ARNi}*), observamos alas que presentaban un compartimento posterior muy

pequeño y la fusión casi completa de las venas 4 y 5 (Figura R29 F). Esta interacción sinérgica se debió a la reducción del tamaño celular (Figura R29 Ñ) y no a una disminución del número de células que forman el compartimento posterior (Figura R29 O).

Para analizar la interacción entre *emc* y la sobre-expresión del fragmento *CG34422-Ct* utilizamos la línea *sal^{EPV}-Gal4*, ya que como describimos en el apartado 2.4, es la única combinación de sobre-expresión viable que hemos encontrado para este fragmento. La combinación de la línea *sal^{EPV}-Gal4* con el ARNi de *emc* (*sal^{EPV}-Gal4; UAS-emc^{ARNi}*) dio lugar a alas prácticamente iguales al control (Figura R29 I, comparar con G). Como ya describimos en el apartado 2.4, la sobre-expresión del fragmento *CG34422-Ct* produce alas más pequeñas que las controles, con desaparición parcial de venas (Figura R29 H, comparar con G). Cuando disminuimos la función de *emc* y al mismo tiempo sobre-expresamos la forma *CG34422-Ct* con *sal^{EPV}-Gal4* (*sal^{EPV}-Gal4 UAS-CG34422-Ct; UAS-emc^{ARNi}*) observamos que las alas eran un 20% más pequeñas que las que sólo expresaban el *UAS-CG34422-Ct* (Figura R29 J, comparar con H).

Analizamos también si, en condiciones de disminución o ganancia de *CG34422*, un cambio en los niveles de *emc* modificaba el número de células en división en los discos. Como ya hemos descrito anteriormente, tanto la disminución de la función de *emc* (*en-Gal4 UAS-GFP; UAS-emc^{ARNi}*) como la de *CG34422* (*en-Gal4 UAS-GFP UAS-CG34422^{ARNi}*) produjeron un descenso en el número de células en mitosis (Figura R29 K). Observamos que la combinación de ambos ARNi (*en-Gal4 UAS-GFP UAS-CG34422^{ARNi}; UAS-emc^{ARNi}*) no ocasionó un mayor descenso de células en mitosis que cada uno de forma independiente (Figura R29 K). Sorprendentemente, encontramos que la fuerte reducción del número de células en mitosis ocasionado por la sobre-expresión del fragmento *CG34422-Nt* con *en-Gal4* (Figura R29 L), se corrigió cuando co-expresamos el ARNi de *emc* (*en-Gal4 UAS-GFP UAS-CG34422-Nt; UAS-emc^{ARNi}*) (Figura R29 L). Como habíamos descrito anteriormente, el ala adulta de esta combinación mutante es significativamente más pequeña que la producida por cada una de las condiciones mutantes por separado (Figura R29 C, D y F), aunque el número total de células es similar al encontrado cuando sólo sobre-expresamos *CG34422-Nt* (Figura R29 O). Sin embargo, sí que observamos que en alas *en-Gal4 UAS-CG34422-Nt; UAS-emc^{ARNi}* se produce una fuerte disminución del tamaño celular (Figura R29 Ñ). Todos estos datos sugieren que la combinación de una falta de función de *emc* con la sobre-expresión de la forma *CG34422-Nt* ocasiona que las células se dividan más que cuando sólo se sobre-expresa *CG34422-Nt*, pero que estas células no pueden incrementar su tamaño. Aún no entendemos las causas de estos efectos y será necesario realizar experimentos adicionales para analizar esta interacción.

En conjunto, estos resultados muestran que *emc* interacciona genéticamente con *CG34422*, tanto en condiciones de falta como de ganancia de función de este gen.

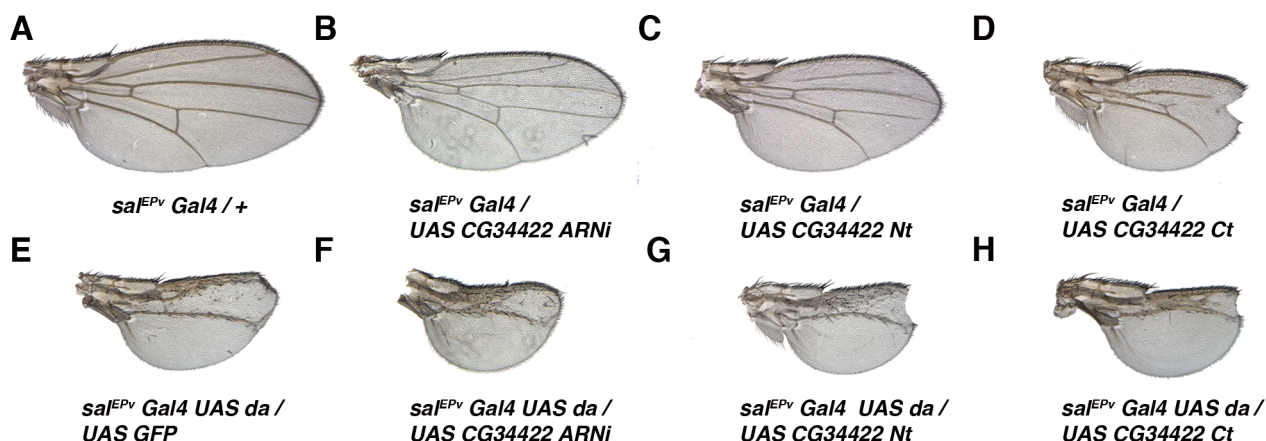


Figura R30: Interacciones genéticas entre el gen *CG34422* y *da*. (A-D) Alas adultas que combinan la línea *sal^{EPV}-Gal4* (A) con el ARNi del gen *CG34422* (*sal^{EPV}-Gal4/ UAS-CG34422^{ARNi}*) (B), o las formas truncadas Nt y Ct de este gen, *sal^{EPV}-Gal4/ UAS-CG34422-Nt*, (C) y *sal^{EPV}-Gal4/ UAS-CG34422-Ct*, (D). (E-H) Alas adultas de los mismos genotipos que en A-D, pero combinados con la sobre-expresión de *UAS-da*: *sal^{EPV}-Gal4 UAS-da/ UAS-GFP* (E), *sal^{EPV}-Gal4 UAS-da/ UAS-CG34422^{ARNi}* (F), *sal^{EPV}-Gal4 UAS-da/ UAS-CG34422-Nt* (G), *sal^{EPV}-Gal4 UAS-da/ UAS-CG34422-Ct* (H). La variación de los niveles de expresión de *CG34422* aumentó el fenotipo de sobre-expresión de *da*.

6. Análisis de los fenotipos resultantes de la interacción genética entre el gen *CG34422* y *daughterless*

En la primera parte de esta Tesis hemos estudiado en profundidad la relación entre *Emc* y la bHLH de tipo I *Daughterless*, observando que la falta de *emc* produce un fuerte aumento de la expresión de *da*. Además, hemos demostrado que al menos parte de las funciones de *Emc* en el control de la proliferación se deben a su interacción con *Da*. De este modo, es posible que algunos de los defectos que producen las alteraciones en los niveles de expresión del gen *CG34422* estén ocasionados por cambios en la actividad de *Da*. Para estudiar esta posibilidad, realizamos interacciones genéticas combinando la sobre-expresión de *da* con las distintas herramientas de falta y ganancia de función que poseemos para el gen *CG34422*.

Como ya se describió en la primera parte, la sobre-expresión de *da* bajo el control de *sal^{EPV}-Gal4* ocasiona una fuerte disminución del tamaño del ala, acompañada del desarrollo de quetas ectópicas (Figura R30 E). Como hemos mostrado anteriormente en esta segunda parte, tanto la disminución de la función de *CG34422* como la sobre-expresión de las formas truncadas *CG34422-Nt* y *CG34422-Ct* con la línea *sal^{EPV}-Gal4*, producen un fenotipo de disminución del tamaño del ala que además puede ocasionar la desaparición de venas en grado variable (Figura R30 B-D). La combinación de la sobre-expresión de *da* tanto con la disminución de la función de *CG34422* (*sal^{EPV}-Gal4 UAS-da/ UAS-CG34422^{ARNi}*, Figura R30 F) como con la sobre-expresión de *CG34422-Nt* y *CG34422-Ct* (*sal^{EPV}-Gal4 UAS-da/ UAS-CG34422-Nt* y *sal^{EPV}-Gal4 UAS-da/ UAS-CG34422-Ct*, Figura R30 G, H) produjo un aumento del fenotipo de sobre-expresión de *da*. Así, observamos que la región de intervena 3-4, que permanecía presente en todos los casos analizados de sobre-expresión de *da*, se veía ahora muy

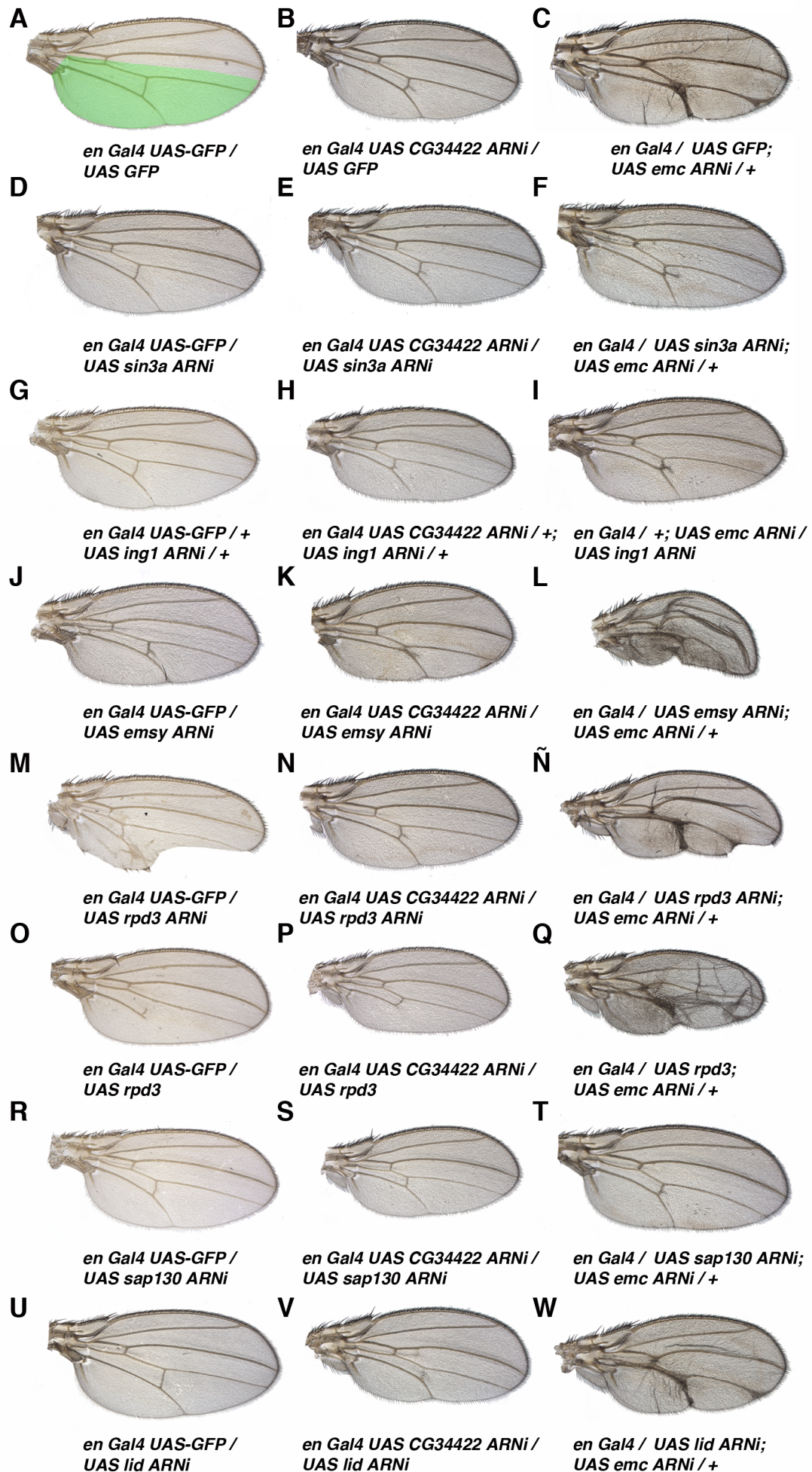


Figura R31: Interacciones genéticas entre los miembros del complejo Sin3A/Rpd3, CG34422 y *emc*. (A, D, G, J, M, O, R y U) Alas adultas que combinan la línea *en-Gal4* (el compartimento posterior está sombreado en verde en A, *en-Gal4* UAS-GFP/ UAS-GFP) con distintas construcciones UAS-ARNi o UAS para los genes del complejo Sin3A/Rpd3: *en-Gal4* UAS-GFP/ UAS-*sin3a*^{ARNi} (D), *en-Gal4* UAS-GFP/ +; UAS-*ing1*^{ARNi}/ + (G), *en-Gal4* UAS-GFP/ UAS-*emcy*^{ARNi} (J), *en-Gal4* UAS-GFP/ UAS-*rpds*^{ARNi} (M), *en-Gal4* UAS-GFP/ UAS-*rpds* (O), *en-Gal4* UAS-GFP/ UAS-*sap130*^{ARNi} (R), *en-Gal4* UAS-GFP/ UAS-*lid*^{ARNi} (U). (B, E, H, K, N, P, S y V) Alas que combinan la línea *en-Gal4* UAS-CG34422^{ARNi} (B, *en-Gal4* UAS-CG34422^{ARNi}/ UAS-GFP) con distintas construcciones UAS-ARNi o UAS para los genes del complejo Sin3A/Rpd3: *en-Gal4* UAS-CG34422^{ARNi}/ UAS-*sin3a*^{ARNi} (E), *en-Gal4* UAS-CG34422^{ARNi}/ +; UAS-*ing1*^{ARNi}/ + (H), *en-Gal4* UAS-CG34422^{ARNi}/ UAS-*emcy*^{ARNi} (K), *en-Gal4* UAS-CG34422^{ARNi}/ UAS-*rpds*^{ARNi} (N), *en-Gal4* UAS-CG34422^{ARNi}/ UAS-*rpds* (P), *en-Gal4* UAS-CG34422^{ARNi}/ UAS-*sap130*^{ARNi} (S), *en-Gal4* UAS-CG34422^{ARNi}/ UAS-*lid*^{ARNi} (V). (C, F, I, L, Ñ, Q, T y W) Alas que combinan la línea *en-Gal4* UAS-*emc*^{ARNi} (C, *en-Gal4*/ UAS-GFP; UAS-*emc*^{ARNi}/ +) con distintas construcciones UAS-ARNi o UAS para los genes del complejo Sin3A/Rpd3: *en-Gal4*/ UAS-*sin3a*^{ARNi}; UAS-*emc*^{ARNi}/ + (F), *en-Gal4*/ +; UAS-*emc*^{ARNi}/ UAS-*ing1*^{ARNi} (I), *en-Gal4*/ UAS-*emcy*^{ARNi}; UAS-*emc*^{ARNi}/ + (L), *en-Gal4*/ UAS-*rpds*^{ARNi}; UAS-*emc*^{ARNi}/ + (Ñ), *en-Gal4*/ UAS-*rpds*; UAS-*emc*^{ARNi}/ + (Q), *en-Gal4*/ UAS-*sap130*^{ARNi}; UAS-*emc*^{ARNi}/ + (T), *en-Gal4*/ UAS-*lid*^{ARNi}; UAS-*emc*^{ARNi}/ + (W).

disminuida, llegando casi a la fusión total de las venas 3-4 cuando se co-expresó *da* con de la forma CG34422-Ct (Figura R30 H).

Los resultados observados sugieren que las variaciones en los niveles de CG34422 podrían acrecentar los fenotipos de sobre-expresión de *da*, al igual que hemos observado en su combinación con la falta de *emc*.

7. Análisis de los fenotipos resultantes de la interacción genética de *emc* y CG34422 con los miembros del complejo Sin3A/ Rpd3

La proteína CG34422 ha sido clasificada molecularmente como parte del complejo proteico Sin3A/Rpd3, cuya función es actuar como modificador del estado de acetilación de la cromatina (ver Introducción). Se seleccionaron distintos miembros de este complejo (*Sin3-Type complex*) mediante un análisis de ontología génica (o *Gene Ontology*, GO) realizado con la base de datos Flybase. Los genes pertenecientes a esta categoría son: *sin3A*, *bin1/sap18*, *p55*, *CG3815*, *brms1l*, *ing1*, *sds3*, *emcy*, *lid*, *rpds*, *sap130* y CG34422.

Con el fin de determinar si este grupo de genes estaban implicados en el desarrollo del ala de *Drosophila*, analizamos los fenotipos que causaba la reducción de la función de cada uno de los miembros del complejo mediante la sobre-expresión de distintos ARNi específicos para cada gen, bajo la regulación de *en-Gal4*. La sobre-expresión de las líneas ARNi para los genes *sin3a*, *ing1*, *emcy*, *rpds* y *sap130* dio lugar a la reducción del tamaño del compartimento posterior de las alas adultas, un fenotipo similar al observado cuando se reduce la función del gen CG34422 (Figura R31 D, G, J, M, R, comparar con A). La reducción de la expresión de *rpds* provocó además la aparición de grandes muescas en el ala y la diferenciación de venas ectópicas (Figura R31 M). Por el contrario, la sobre-expresión de este gen causó la desaparición parcial de la vena 5, aunque también ocasionó la reducción del tamaño del compartimento posterior (Figura R31 O).

Como hemos mostrado, cambios en los niveles de algunos de los miembros del complejo Sin3A/Rpd3 conducen a una disminución del tamaño del ala adulta. Dado que la proteína CG34422 forma parte del complejo, quisimos saber a continuación si la alteración simultánea de la función de más de un miembro del complejo podía incrementar este fenotipo. Con este fin, realizamos distintas combinaciones genéticas entre miembros de este complejo y el gen *CG34422*. Para ello, utilizamos tanto condiciones de falta de función como de exceso de función de los distintos genes analizados. Así, cruzamos moscas *en-Gal4 UAS-CG34422^{ARNi}* por *UAS-gen X^{ARNi}* o *UAS gen X*, siendo el gen X cada uno de los miembros del complejo estudiado. Nuestros datos indican que la reducción de los genes *ing1*, *emsy*, *sap130* y *lid* potencia el fenotipo de falta de función del gen *CG34422*, dando lugar a alas con el compartimento posterior muy reducido (Figura R31 H, K, S y V, comparar con B). Este resultado podría indicar que los citados genes colaboran con el gen *CG34422* para mantener el crecimiento del ala. En el caso del gen *rpdp3*, la combinación de su ARNi con el *CG34422^{ARNi}* condujo a un rescate del fenotipo producido cuando sólo se expresó el ARNi de *rpdp3* (comparar Figura R31 N con M). En cambio, cuando aumentamos la expresión de *rpdp3* y bloqueamos la función de *CG34422*, las alas resultantes fueron más pequeñas que las observadas en ambas condiciones por separado (Figura R31 P, comparar con O y B).

A continuación, estudiamos si el complejo Sin3A/Rpd3 podría mediar alguna de las funciones que hemos descrito para *emc* durante el desarrollo del ala, presumiblemente a través su interacción con *CG34422*. Si fuera así, esperaríamos que variaciones en los niveles de los componentes del complejo Sin3A/Rpd3 podrían modificar los efectos producidos cuando la función de *emc* se reduce. Para estudiar esta hipótesis, repetimos el experimento descrito anteriormente, y realizamos distintas combinaciones genéticas entre los miembros del complejo Sin3A/Rpd3 y *emc*. Encontramos que la reducción de los genes *sin3a*, *ing1* y *sap130* produce un rescate del fenotipo de falta de función de *emc*, de modo que obtuvimos alas con un compartimento posterior de tamaño cercano al control, que no presentaban fusión entre las venas 4 y 5 (Figura R31 F, I y T, comparar con C). Por el contrario, la reducción de los genes *emsy*, *lid* y *rpdp3*, así como la sobre-expresión de este último, producen un aumento del fenotipo de falta de *emc*, disminuyendo aún más el tamaño del compartimento P y fusionando casi por completo las venas 4 y 5 (Figura R31 L, Ñ, Q y W comparar con C).

El resumen de los resultados que se obtuvieron se encuentra representado en la Tabla 1. Todas las combinaciones realizadas con el gen *p55* resultaron letales, de modo que sería necesario expresar el ARNi de este gen con una línea de expresión más restringida (como por ejemplo la línea *sal^{EPV}*) para poder observar su fenotipo y su interacción con *CG34422* y *emc*. Los genes *lid* e *ing1*, que no presentaron fenotipo de disminución de tamaño en el ala a 25º C, sí que redujeron el tamaño de la misma a 29º C.

Los resultados mostrados sugieren que *emc* podría estar modulando la actividad del complejo Sin3A/Rpd3 a través de su interacción con *CG34422* durante el crecimiento del disco del ala.

Tabla 2: Interacciones complejo Sin3A/Rpd3, CG34422 y Emc				
Complejo SIN3A/Rpd3		<i>en Gal4 GFP</i>	<i>en Gal4 CG34422^{ARNi}</i> 76%	<i>en Gal4 emc^{ARNi}</i>
Sin3A	UAS-ARNi	- T leve 92%	- T, F CG 78%	resc + T
Bln1 / Sap 18	UAS-ARNi	WT	-T; F CG	- T, F emc
Caf1/ P55	UAS-ARNi	L	L	L
CG3815	UAS-ARNi	WT	-T; F CG	-T, F emc
Brms1L	UAS-ARNi	WT	-T; F CG	-T, F emc
Ing1	UAS-ARNi	WT	- -T, F CG 65%	resc + T
Sds3	UAS-ARNi	- T leve	-T; F CG	-T, F emc
Emsy	UAS-ARNi	- T 82%	- -T, F CG 64%	- -T, F emc
Lld	UAS-ARNi	WT	- -T, F CG	- -T, F emc
Rpd3	UAS	- T, -V5 82%	- - T, F CG, -V5 58%	- -T, F emc
	UAS-ARNi	- T, N, EV 59%	- T, F CG 76%	- -T, F emc
Sap130	UAS-ARNi	- T 85%	- - T, F CG 63%	resc + T

T= cambio tamaño; F CG= fenotipo como ARNi de **CG34422**; F emc= fenotipo como ARNi de **emc**; - V5: falta vena 5, L= letal, N= nicks, EV= Extravena, resc= rescate fenotipo producido por ARNi de emc

Tabla 2: Interacciones del complejo Sin3A/Rpd3, CG34422 y Emc. En la tabla se muestra el resumen de los resultados obtenidos en las distintas interacciones entre los genes del complejo Sin3A/Rpd3, CG34422 y *emc*. El cambio en el área del compartimento P expresado en % respecto al control *en-Gal4 UAS-GFP* (al que se le otorgó el valor 100%) se encuentra detallado en cada celda de la tabla. Las combinaciones con el ARNi de *emc* no se cuantificaron debido las características del fenotipo de reducción de la función de *emc*, por el cual muchas alas no están correctamente estiradas, y las medidas que se hacen sobre ellas son imprecisas. En el pie de la tabla se indica la clave utilizada para resumir lo fenotipos encontrados en cada caso.

Discusión

Entender los mecanismos genéticos y moleculares que controlan la división celular durante el desarrollo es fundamental para comprender cómo se establece el tamaño final de un organismo. Además, fallos en estos mecanismos pueden dar lugar a un incremento de la proliferación de forma descontrolada, que es la causa subyacente del desarrollo de muchos tumores. Qué genes están interviniendo en el control de la división celular, y cómo distintas señales regulan y coordinan la progresión del ciclo celular y su salida, son cuestiones fundamentales que es necesario responder para poder comprender el intrincado programa genético que determina la salida del ciclo celular y la entrada en diferenciación. Existen multitud de genes que de manera directa o indirecta pueden controlar la proliferación durante el desarrollo. Una de las familias de genes que se ha asociado con este proceso es la de las bHLH. Una característica fundamental de esta familia génica es que no sólo está involucrada en el control de la proliferación, sino que además juega un papel fundamental en el control de la definición de distintos destinos celulares, de manera que su función es fundamental para coordinar la entrada en diferenciación y salida del ciclo celular. El trabajo presentado en esta Tesis ha servido para proponer un mecanismo molecular novedoso acerca de cómo miembros de la familia de las bHLH regulan la progresión del ciclo celular, y por lo tanto la proliferación celular.

1. *Emc* y *Daughterless* controlan la progresión del ciclo celular regulando la expresión de *string*

Las proteínas de la familia bHLH de clase I, o proteínas “E”, así como sus inhibidores, las proteínas Id, son esenciales en el control de la proliferación de una gran variedad de tipos celulares (Peverali *et al.*, 1994; Engel y Murre, 2004; Song *et al.*, 2004; Lyden *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 1994; Lasorella *et al.*, 2002). Los dos representantes de las clases I y V en *Drosophila*, *Daughterless* y *Extramacrochaetae*, respectivamente, se expresan en los tejidos epiteliales, y cambios en su expresión bloquean la proliferación. Estos hechos sugieren que estas proteínas están involucradas en el control de la salida del ciclo celular y la entrada en diferenciación (de Célis *et al.*, 1995; Vaessin *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995).

La proteína *Emc* regula negativamente la expresión y actividad de *Da* (Bhattacharya y Baker, 2012), lo que sugiere que los defectos en la proliferación ocasionados por la falta de *emc* se deben al aumento de expresión y actividad de *Da*. Nuestros resultados confirman que la eliminación de *da* en células que simultáneamente carecen de *emc* suprime la mayoría de los defectos de crecimiento causados por la falta de *emc*. Así pues, entender cómo *Da* controla la proliferación es crucial para comprender los mecanismos a través de los cuales *emc* regula este proceso. Hemos observado que tanto la eliminación de *emc* como la sobre-expresión de *da* producen un descenso en el número de células en división. Este hecho parece deberse principalmente a que en ambas condiciones se produce una acumulación de células en la fase G2 del ciclo celular que provoca que la transición G2/M ocurra a una velocidad menor de la normal. La sobre-expresión de *da* produce una reducción en la expresión de *stg*, y los defectos en el crecimiento que muestran los discos imaginales mutantes para *emc* o los que sobre-expresan *da* se suprimen al expresar ectópicamente este gen. Estos resultados nos indican que el defecto en la transición G2/M se debe a que tanto la eliminación de

emc como la sobre-expresión de *da* reducen la expresión o la función de la fosfatasa *string*, principal regulador de esta transición.

Considerando que Da es un factor de transcripción y que regula la transcripción mediante su unión directa al ADN, el modelo más simple para explicar todas nuestras observaciones sería aquel en el que Da se une a la región promotora de *stg* y regula su expresión. Para evaluar esta posibilidad, hemos estudiado la región reguladora de *stg* buscando las regiones que dirigen su expresión en los discos imaginales. Hemos encontrado tres fragmentos situados a lo largo de esta región que reproducen diferentes aspectos del patrón de expresión de *stg* en los discos imaginales. En estas regiones, hemos encontrado sitios putativos de unión para Da y tanto los resultados obtenidos en nuestros experimentos de ChIP como los datos recogidos en el proyecto modENCODE, sugieren que Da se une *in vivo* a éstas y otras regiones del promotor de *string*. Finalmente, hemos encontrado que Da reprime *in vivo* la expresión de genes reporteros que se encontraban bajo el control de distintas regiones reguladoras del promotor de *stg*. Todos estos datos son congruentes con un modelo en el cual Da está regulando directamente la expresión de *stg*, de manera que el principal efecto de *emc* en la regulación del ciclo celular sería el control de la expresión de *stg* a través de Da.

2. Daughterless actúa como represor transcripcional de *string*

Nuestros datos indican que Da se comporta como un represor transcripcional de *stg*. La función de Da como activador transcripcional ha sido ampliamente estudiada durante la neurogénesis, donde se ha descrito que su función es fundamental para activar la transcripción de genes necesarios para la diferenciación neuronal (Brown *et al.*, 1996; Caudy *et al.*, 1998b; Vaessin *et al.*, 1994; Jafar-Nejad *et al.*, 2006). Hasta el momento, la única función de Da como represor transcripcional que había sido descrita ocurría durante la miogénesis somática. Durante este proceso, la bHLH de clase II Twist, que durante la fase embrionaria activa la miogénesis formando homodímeros Twi/Twi, puede cambiar su función y convertirse en un represor al formar heterodímeros con Da. Así, los complejos Da/Twi se unen al promotor de *dMef2*, inhibiendo su transcripción (Wong *et al.*, 2008). De este modo, es posible que Da ejerza distintos papeles en el control de la transcripción, dependiendo de las proteínas a las que se una para llevar a cabo cada función. Durante el desarrollo de los discos, Da forma heterodímeros con otras proteínas bHLH para regular la transcripción de distintos genes diana. Nuestros resultados muestran que Da no interacciona ni con las proteínas del complejo Ac-Sc ni con el complejo E(spl) para regular la proliferación. Tampoco estaría implicado en esta función el co-represor Groucho. De manera que, o bien Da estaría formando heterodímeros con otras proteínas bHLH que no hemos identificado en este estudio, o formaría homodímeros que podrían funcionar como represores transcripcionales de *stg*. El hecho de que hayamos observado mediante experimentos *in vitro* que Da es capaz de unirse por sí solo (probablemente formando homodímeros Da/Da) a la región promotora de *stg* y suprimir su expresión, sugiere que este mecanismo también podría estar operando *in vivo*.

Trabajos previos han mostrado que existe una región en la secuencia proteica de Da (denominada dominio Rep) que funciona como dominio represor. Se ha descrito que este dominio es fundamental para la función represora que Da ejerce durante la miogénesis, tanto en vertebrados como en *Drosophila*, donde se ha observado que su eliminación suprime la capacidad de Da para reprimir transcripcionalmente a dMef2 (Markus *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2008). Nuestros datos indican que el dominio Rep no está implicado en controlar las funciones de Da como inhibidor de la proliferación, ya que la sobre-expresión de la forma mutante *da-Δ-Rep* produjo los mismos fenotipos que la sobre-expresión de la forma silvestre, incluyendo la represión transcripcional de *stg*. El comportamiento de *da-Δ-Rep* sugiere que deben existir dominios de la proteína Da alternativos mediante los cuales ésta pueda ejercer su función represora.

3. Emc y Daughterless podrían estar regulando otras fases del ciclo celular

Como hemos explicado anteriormente, todos nuestros datos indican que el principal efecto de Da y Emc en la regulación del ciclo celular se produciría a través de la regulación transcripcional de *stg*. Sin embargo, no podemos descartar que Da y/o Emc estén regulando, además de la transición G2/M, otras fases del ciclo celular. Por un lado hemos encontrado que aunque la sobre-expresión de *stg* produjo un rescate muy notable de los fenotipos de sobre-expresión de *da*, las alas resultantes de esta combinación no son exactamente iguales en tamaño a las silvestres. Por otro lado, hemos descrito que las células mutantes para *emc* presentan un retraso en el tiempo de duplicación celular, que no se ha observado cuando se manipulan los niveles de expresión de otros reguladores de la transición G2/M. Por ejemplo, la sobre-expresión de la quinasa Wee 1, que fosforila al complejo CycB/Cdk2, da lugar a una acumulación de células en la fase G2 del ciclo. Sin embargo, estas células no presentan un retraso en su tiempo de duplicación celular, debido a que el aumento de la duración de la fase G2 esta acompañado por un acortamiento en la duración de la fase G1 del ciclo (Reis y Edgar, 2004).

Por otro lado, hemos encontrado que la reducción de la función de *da* en el ala produce un aumento de tamaño de la misma que no lleva asociado con un aumento de la expresión de *stg*. Además, la sobre-expresión de *stg* no produce un mayor número de divisiones (Neufeld *et al.*, 1998a), lo que refuerza la posibilidad de que *da* participe en el control de otros aspectos del ciclo celular aún por elucidar.

Estos resultados sugieren que *emc* y *da* podría estar modulando distintas transiciones durante la progresión del ciclo.

4. Redundancia funcional entre Daughterless y otros factores en la represión transcripcional de *string*

De acuerdo con nuestro modelo, en el que Da se comporta como un represor transcripcional de *stg*, esperaríamos que la reducción de la actividad de *da* produjera un incremento en la expresión de *stg*. Sin embargo, hemos observado que la eliminación de *da* no aumenta los niveles globales de expresión de *stg*, ni tampoco causa la activación de su región reguladora. Una posible explicación a estos resultados es que Da actúe de manera redundante con otros represores. La existencia de varios represores transcripcionales que pudieran actuar simultáneamente sobre *stg* conferiría una mayor robustez al control del ciclo celular, de forma que éste pudiera progresar en condiciones de ausencia o disminución de Da. Algunos de nuestros datos apoyan esta hipótesis. Así, durante la caracterización de la región reguladora de *stg* hemos definido que la región promotora mínima, situada en las 0,7 Kb anteriores al inicio de la transcripción, se comporta como una región represora de la actividad de *stg* en los discos imaginales. Esta región reprimió completamente la expresión en el disco de ala del reportero *sal^{EPV}-eGFP*, lo que indica que este fragmento se encargaría de limitar la expresión de *stg* *in vivo* en los discos imaginales. Esta función represora estaría mediada por la unión de Da a este fragmento del promotor, ya que hemos observado que la eliminación de los sitios de unión de Da suprime parcialmente los efectos represores de esta región promotora. Sin embargo, la eliminación de la función de *da* mediante un ARNi no fue suficiente para reproducir el mismo efecto, sugiriendo que además de Da, otra/s proteínas podrían unirse a esta región y funcionar de manera redundante con ella.

Alternativamente, es posible que para que *stg* pueda activarse transcripcionalmente, no sólo deban relajarse los mecanismos que mantienen reprimida su transcripción, sino que además tienen que activarse factores de transcripción que promuevan su expresión. Un ejemplo de este tipo de regulación ocurre en el desarrollo del ojo. Durante este proceso la expresión de *stg* está regulada por el factor de transcripción Pointed, que actúa en respuesta a la activación de la ruta del EGFR, y el represor transcripcional Tramtrack 69. En este contexto, se ha observado que la ausencia del represor Tramtrack 69 no es suficiente para activar la expresión de *stg*, ya que es necesaria la presencia de una señal positiva, en este caso la de Pointed (Baonza *et al.*, 2002). De este modo, es posible que la eliminación de *da* no sea suficiente para producir *per se* la activación transcripcional de *stg*, en cuyo caso sería necesaria la presencia de un elemento activador.

5. Emc y la competición celular

Como hemos descrito anteriormente, la ausencia de *emc* bloquea la proliferación en varios tejidos. Sin embargo, este defecto se corrige, al menos parcialmente, cuando a las células mutantes para *emc* se les da una ventaja proliferativa (de Celis *et al.*, 1995; Bhattacharya y Baker, 2012). Este hecho sugiere que *emc* no es absolutamente necesario para que la división celular tenga lugar, aunque su función sí sería requerida en un contexto de células proliferando de manera competitiva. Trabajos previos han descrito que las células mutantes para *stg* sólo pueden dividirse una vez, dando

lugar a clones de dos células que son eliminados. Sin embargo, es posible generar clones de gran tamaño con condiciones hipomorfas para *stg*, cuando se les da una ventaja proliferativa con la técnica *Minute* (Lehman *et al.*, 1999). Este hecho indica que las células con una insuficiencia para *stg* se dividen más lentamente, de manera que serían reconocidas por las células silvestres circundantes y eliminadas del tejido. Por lo tanto, células mutantes para un gen absolutamente necesario para que la progresión del ciclo celular tenga lugar, como es *stg*, también estarían sometidas a competición celular. Así, los defectos proliferativos causados por una insuficiencia de *stg* podrían ser rescatados, al menos parcialmente, cuando a estas células se les da una ventaja proliferativa. Estos resultados son coherentes con nuestra propuesta de que el principal defecto que tienen las células mutantes para *emc*, o las que sobre-expresan *da*, es la disminución de la expresión de *stg*. De acuerdo con nuestras observaciones, cuando eliminamos *emc* o sobre-expresamos *da*, se produce una reducción de la expresión de *stg*, lo que daría lugar a que se redujera el ritmo de proliferación de las células mutantes, que crecerían con dificultad en el entorno competitivo del disco del ala. De este modo, cuando a estas células mutantes se les diera cierta ventaja competitiva, se podría restaurar parcialmente su ritmo de división.

6. Funciones de *Emc* y *Daughterless* en la regulación de la proliferación celular en el disco de ala

¿Qué funciones podría desempeñar en el disco de ala la regulación de *stg* por *Da* y la regulación de *da* por parte de diferentes proteínas con dominio HLH? Con la excepción de la región del borde D/V, la división celular en el disco imaginal de ala ocurre de manera aleatoria. En el borde D/V, sin embargo, se producen diferentes sincronías en el ciclo celular que están reguladas por las proteínas proneurales *Achaete* y *Scute*. La expresión de estos genes se activa en dos bandas de células adyacentes a las células del borde D/V en el compartimento posterior (Phillips y Whittle, 1993). Estas células se encuentran retenidas en la fase G2 del ciclo celular, formando la llamada “zona de no proliferación” (ZNC) (O’Brochta y Bryant, 1985; Hartenstein y Posakony, 1989), y se ha propuesto que *Ac-Sc* reprimen transcripcionalmente a *stg* en estos dominios (Johnston y Edgar, 1998). Esta propuesta está basada en el hecho de que la sobre-expresión de *sc* en el disco de ala es suficiente para parar las células en G2. Nosotros hemos encontrado que la sobre-expresión de *sc* produce un aumento de los niveles de expresión de *Da*. Dado que *Da* reprime transcripcionalmente a *stg*, es posible que el efecto causado por la sobre-expresión de *sc* sobre *stg* se deba a que este gen, directa o indirectamente, produce un incremento de *Da* y por consiguiente la represión de *stg*. Así pues, cabe pensar que durante el desarrollo del disco, *Da* es necesario para el establecimiento de la ZNC, actuando como un represor de *stg* y deteniendo las células en G2. Por otro lado, como hemos mostrado, la expresión de *Emc* es alta en las células del borde D/V y más baja en las células adyacentes a él, patrón complementario al de *Da*. Esta distribución es compatible con que *Emc* contribuya a regular a *Da* en esta región en que se produce la represión de *stg*.

En otras regiones del disco donde no existen sincronías en el ciclo celular, *Emc* regularía la división celular reprimiendo a *Da*. En este escenario, las señales extracelulares que regulasen la expresión de *emc* podrían modular los niveles de *Da* (Figura D1). Una de estas señales es la ruta

de Notch, cuya actividad regula la transcripción de *emc* en el disco de ala (Baonza y García-Bellido, 2000). La activación ectópica de Notch induce un fuerte aumento de la proliferación durante el desarrollo de los discos imaginales (Go *et al.*, 1998; Baonza y García-Bellido, 2000; Giraldez y Cohen, 2003). En respuesta a Notch, las bHLH Deadpan y algunos de los miembros del complejo E(spl) son activados y actúan promoviendo la aparición de sobre-crecimientos (San Juan *et al.*, 2012). En este trabajo hemos encontrado que la eliminación de *emc* o la sobre-expresión de *da* son suficientes para suprimir los sobre-crecimientos causados por la expresión ectópica de *Notch*, lo que indicaría que Notch promueve la expresión de distintas bHLH, incluida *emc*, para mantener a las células en un estado proliferativo, al menos en parte a través de la represión de *da*. Considerando que el control de los niveles de Emc resulta crucial para regular la actividad de Da, otras rutas de señalización podrían estar actuando sobre *emc* para modular la actividad y/o expresión de Da, y así controlar la progresión del ciclo celular (Figura D1).

Los mecanismos que controlan el ciclo celular están conservados en distintos organismos, de modo que es posible que el papel que juegan Emc y Da en el control de la proliferación en *Drosophila* se conserve más allá de *Drosophila*. Las proteínas Id ejercen un importante control de la transición G1/S en vertebrados. Nuestros datos indican que sus ortólogos en *Drosophila* están regulando la

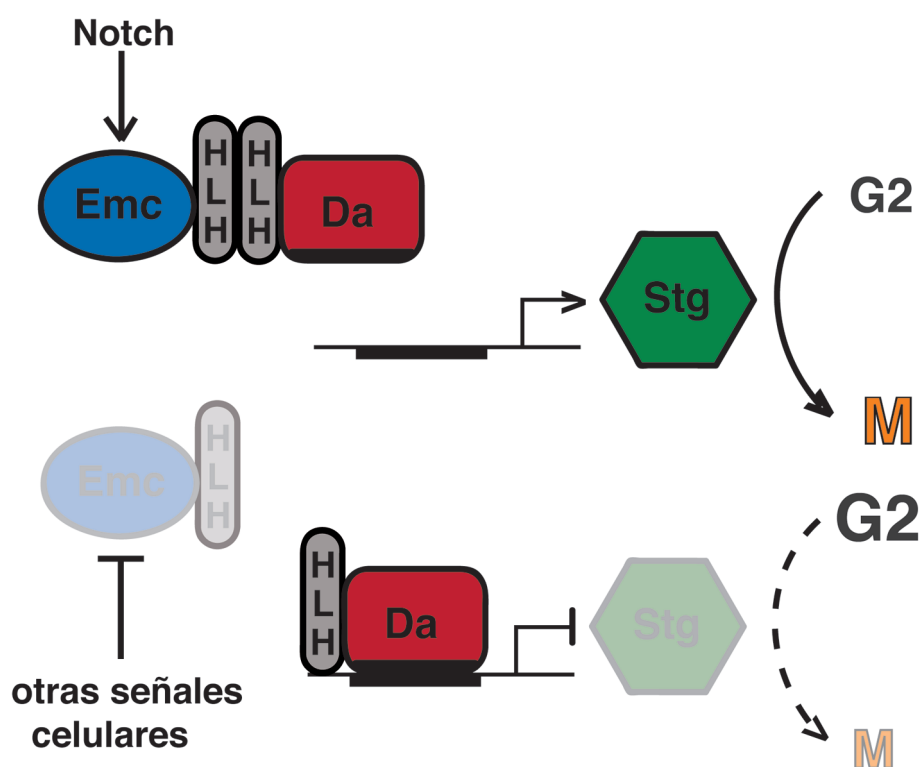


Figura D1: Esquema del mecanismo de acción de las bHLH Emc y Da en la regulación de *string*. Altos niveles de Emc aumentan la proporción de heterodímeros Emc/Da, que impiden que Da se una al ADN. El ciclo celular progresa con normalidad en esta situación. Algunas señales como la activación de la vía de Notch pueden aumentar la cantidad de Emc, hecho que favorece la proliferación celular. Bajo distintas condiciones, otras señales celulares podrían promover la eliminación de Emc. En este caso, los niveles de Da libre aumentarían y ésta se uniría a la región reguladora de *stg*, reprimiendo la expresión del mismo. Los bajos niveles de Stg condicionan un retraso en la transición G2/M del ciclo celular, favoreciendo la acumulación de células en G2 y disminuyendo la proliferación.

transición G2/M, de modo que sería interesante saber si tanto los Id como las proteínas E controlan la proliferación a través de la regulación de la expresión de *cdc25* en otros organismos. La inducción de proliferación ectópica implica la desregulación de distintas fases del ciclo celular. Dado que las proteínas Id están muy relacionadas con el desarrollo de tumores (que conlleva una activación de la proliferación), es razonable suponer que estas proteínas puedan estar implicadas en la regulación de distintas fases del ciclo celular.

7. Función del gen *CG34422* durante el desarrollo del disco de ala

Según muestran nuestros resultados, *Emc* controla la transición G2/M del ciclo celular a través de su interacción con *Daughterless*. Sin embargo, desconocemos si el aumento de expresión *da* que se produce en condiciones de falta de función de *emc* es responsable de todos los fenotipos que causa la falta de función de este gen, tanto los que se refieren al desarrollo del ala, como los que se producen durante el desarrollo de otros órganos, como los sistemas nervioso, traqueal, o muscular (Cubas *et al.*, 1994). *Emc*, a través de su región HLH podría interaccionar con proteínas que no pertenecieran a la familia bHLH, tal y como se ha descrito para sus ortólogos en vertebrados (Lasorella *et al.*, 2000). De este modo, para encontrar nuevos factores candidatos a mediar las funciones de *Emc* en el desarrollo, en el laboratorio se llevó a cabo un ensayo de Doble Híbrido que sirvió para identificar diferentes proteínas que se unían a la región HLH de *Emc*. Una de las proteínas identificadas fue *CG34422*, que se unió a *Emc* tanto en el ensayo de Doble Híbrido como en experimentos de inmunoprecipitación. Encontramos que *CG34422*, cuyas funciones no se habían descrito aún en *Drosophila*, tiene como ortólogos en vertebrados a las proteínas *Arid4a* y *Arid4b*, también llamadas *Rbp1* y *Rbp2*. *CG34422* reúne características de ambas isoformas, ya que si bien tiene una identidad de secuencia mayor con *Arid4b*, posee un dominio en su extremo carboxilo terminal exclusivo de *Arid4a*, mediante el cual esta proteína se une al factor del Retinoblastoma (Fattaey *et al.*, 1993). Las proteínas *Arid* tienen un papel relevante durante la progresión del ciclo celular en vertebrados, ya que se ha descrito que modifican la transcripción del factor E2F a través del reclutamiento de un complejo modificador de la cromatina, el complejo Sin3A (Lai *et al.*, 2001; Zhang y Dean, 2001). Hasta ahora, se desconoce si *CG34422* conserva estas funciones en *Drosophila*, y si es necesario para reclutar al complejo Sin3A de la misma manera que en vertebrados.

La falta de función de *CG34422*, producida por la expresión en el ala de un ARNi dirigido específicamente contra este gen, dio lugar a alas más pequeñas que las controles. Esta reducción de tamaño se debe a una disminución del número de células en división en los discos imaginales. En estas alas mutantes, las venas y los órganos sensoriales se diferencian con normalidad, lo que sugiere que la principal función de este gen durante el desarrollo del disco de ala es controlar la proliferación celular. Sin embargo, dado que el ARNi dirigido contra *CG34422* no elimina completamente su ARNm, esta caracterización fenotípica está basada en una condición hipomorfa. Por lo tanto, para definir de forma precisa la función de este gen durante el desarrollo, será necesario estudiar condiciones más extremas de falta de función. Nuestros datos muestran que la sobre-expresión en el ala de un fragmento de la región N-terminal de *CG34422* produce fenotipos similares a los observados con la

expresión del ARNi, aunque más acusados. Estos fenotipos mostraron una disminución del tamaño del ala adulta como consecuencia de un descenso en la proliferación celular durante el desarrollo de los discos. La sobre-expresión de este fragmento en un fondo heterocigótico para una deficiencia que contiene al gen *CG34422* produjo un aumento del fenotipo de reducción de tamaño del ala, lo que nos indica que la sobre-expresión de la forma *CG34422-Nt* podría estar produciendo un efecto dominante negativo. La sobre-expresión del fragmento C-terminal de *CG34422* en el ala también produjo una reducción del tamaño de la misma, debido a un descenso de la proliferación celular durante el desarrollo del disco imaginal. A diferencia de lo que ocurría con la sobre-expresión de la forma *CG34422-Nt*, la sobre-expresión de *CG34422-Ct* dio lugar a la desaparición de venas y la formación de muescas en el margen del ala. Además, la expresión de esta última forma también indujo muerte celular en el disco imaginal. Aunque estos efectos sugieren que la expresión de *CG34422-Ct* podría corresponderse con una ganancia de función del gen *CG34422*, nuestros datos utilizando la deficiencia que incluye a este gen indican que la sobre-expresión de *CG34422-Ct* tiene efectos dominantes negativos. Por lo tanto, las diferencias entre los fenotipos causados por la sobre-expresión de las dos formas truncadas podrían deberse a que ocasionan distintos grados de falta de función del gen *CG34422*. Los datos obtenidos con la sobre-expresión de las formas truncadas de la proteína *CG34422* refuerzan la idea de que la función del gen *CG34422* es necesaria durante el control de la proliferación de los discos.

Según lo descrito para los ortólogos en vertebrados de la proteína *CG34422*, la función de este gen sería necesaria para el reclutamiento del complejo Sin3A, que actúa como silenciador del promotor de E2F (Lai *et al.*, 2001; Zhang y Dean, 2001), disminuyendo su actividad y ralentizando el ciclo celular. En este trabajo hemos encontrado que la reducción de la expresión de *CG34422* produce un aumento de la expresión del reportero la actividad de E2F, PCNA. Sin embargo, este resultado no es congruente con los fenotipos de disminución de la proliferación que hemos encontrado en estas condiciones, ya que un aumento de la expresión de PCNA está generalmente relacionado con un incremento de la división celular. Desconocemos las razones de este resultado contradictorio, aunque una posibilidad es que este gen actúe a distintos niveles en la regulación de la proliferación. Así, aunque la actividad de E2F estuviera incrementada como consecuencia de la falta de función de *CG34422*, éste podría también ser necesario para promover la función de otros activadores de la progresión del ciclo celular.

8. Función de *CG34422* como mediador de las funciones de *Emc*

Nuestros resultados indican que el gen *CG34422* interacciona genéticamente con *emc*. Hemos observado que la reducción de la función de ambos genes en el ala ocasiona una disminución del número de células que la componen, superior a la observada cuando redujimos la expresión de ambos genes de forma independiente. Esta interacción sinérgica sugiere que *emc* y el gen *CG34422* cooperan para estimular la proliferación celular en el disco de ala. Sin embargo, la reducción del tamaño de estas alas doblemente mutantes no se refleja en una disminución en el número de mitosis durante el desarrollo de los discos. Este dato sugiere que la falta de función de *emc*, combinada con

la falta del gen *CG34422*, da lugar a un incremento en la duración del ciclo celular. Para demostrar esta idea, sería necesario medir el tiempo de duplicación celular en clones de falta de función de ambos genes. En el caso de *emc*, sabemos que su falta de función produce la acumulación de células en la fase G2 del ciclo, si bien aún desconocemos las posibles funciones del gen *CG34422* sobre la progresión del ciclo celular. Dado que *Emc* y *CG34422* interaccionan molecularmente, es posible que *Emc*, además de regular la transición G2/M a través de *Da* y *stg*, pudiera estar afectando otras fases del ciclo celular mediante su interacción con *CG34422*. Esta hipótesis concuerda con el hecho de que las células mutantes para *emc* presenten un retraso en el tiempo de duplicación celular, mientras que este retraso no ocurre en células mutantes para otros reguladores de la transición G2/M. Esto sugiere que, además de *stg*, *emc* podría controlar la actividad y/o expresión de distintos reguladores del ciclo celular, y esta función podría estar mediada por *CG34422*.

La combinación de la reducción de *emc* con la sobre-expresión del fragmento *CG34422-Nt* dio lugar a un efecto distinto al observado para la falta de función de este gen. Nuestros resultados muestran que las alas resultantes de esta combinación genética presentan un área muy reducida, que se debe a una fuerte disminución del tamaño celular. Sorprendentemente, observamos que el número de mitosis en estos dobles mutantes fue mayor que el observado cuando sólo se sobre-expresó la forma *CG34422-Nt*. Estos resultados tendrían sentido si las células con baja expresión de *emc* y alta expresión del fragmento *Nt* tuviesen un ciclo celular muy rápido, de modo que a pesar del aumento en el número de mitosis, las células no tuviesen tiempo de crecer hasta su tamaño silvestre, dando lugar a alas adultas con células muy pequeñas. Este resultado afianza la idea de que *Emc* y *CG34422* podrían actuar controlando el tiempo de duración del ciclo celular, si bien aún es necesario esclarecer el mecanismo por el cual llevarían a cabo esta función.

9. Relación funcional entre *CG34422* y *Daughterless*

Como hemos mencionado anteriormente, *Emc* interacciona con *Da* para regular varios procesos durante el desarrollo del disco de ala. De esta manera, es posible que *CG34422*, a través de su unión a *Emc* o de forma independiente a ella, pudiera interaccionar con *Da* durante el desarrollo. Así pues, quisimos saber si el fenotipo producido por un aumento de expresión de *da* (que como hemos analizado previamente se produce cuando baja la expresión de *emc*) podía modificarse cuando variamos la expresión de *CG34422*. Las alas resultantes de la combinación de la sobre-expresión de *da* con la reducción de la función del gen *CG34422*, o con la sobre-expresión de los fragmentos *Nt* y *Ct*, fueron más pequeñas que las obtenidas tras sobre-expresar únicamente *da*. Sin embargo, es complicado extraer conclusiones fiables de estas interacciones, ya que la sobre-expresión de *da* bajo el control de la línea *sal^{EPV}-Gal4* produjo alas muy pequeñas, lo que hace difícil incrementar ese fenotipo de reducción de tamaño. Así pues, sería necesario realizar experimentos alternativos para poder esclarecer si *Da* y *CG34422* comparten funciones durante el desarrollo del ala.

10. Emc como un posible modulador de cambios epigenéticos

Diversos trabajos han mostrado que el complejo Sin3A tiene un importante papel controlando la proliferación celular en *Drosophila* (Das *et al.*, 2013). En nuestro análisis, hemos encontrado que los genes *sin3a*, *sap130*, *p55*, *rp3*, *lid* y *emc* son necesarios durante el desarrollo del ala para mantener su tamaño. Estos resultados preliminares están de acuerdo con observaciones previas en las que se ha encontrado que algunos de los genes de este complejo controlan la proliferación celular (Taylor-Harding *et al.*, 2004; Secombe *et al.*, 2007; Sambasivan *et al.*, 2008), en algunas ocasiones a través del control transcripcional de genes reguladores del ciclo celular (Pile *et al.*, 2002; Swaminathan y Pile, 2010; Swaminathan *et al.*, 2012). Además, hemos encontrado que los genes *ing1*, *sds3* y *CG34422*, que no habían sido estudiados previamente, comparten esta función con el resto de los miembros del complejo. La deacetilasa Rpd3, que es necesaria para la proliferación celular en el ala (Pile *et al.*, 2002), ha mostrado tener varias funciones durante su desarrollo ya que hemos observado que la variación de sus niveles de expresión disminuye el tamaño y modifica el patrón de venas de la misma. Además, nuestros resultados sugieren que el producto del gen *CG34422* podría actuar como un regulador negativo de Rpd3, ya hemos encontrado que la reducción de la función del gen *CG34422* suprime los fenotipos causados por la reducción de *rp3* en el ala, mientras que aumenta los mostrados por su sobre-expresión. Creemos que *CG34422* podría cooperar con muchos de los genes del complejo para mantener la proliferación en el ala, ya que hemos observado que la reducción simultánea de la función de más de uno de los miembros del complejo incrementa los fenotipos de falta de crecimiento del ala.

Así pues, nuestros datos, junto con los de trabajos previos, apoyan la idea de que el complejo Sin3A/Rpd3 regula la proliferación durante el desarrollo del ala, si bien los mecanismos a través de los cuales actúa están, en muchos de los casos, aún por elucidar.

Hemos encontrado que la función de Emc podría depender de su interacción con el complejo Sin3A/Rpd3 ya que, según nuestros resultados, mantiene relaciones de distinto signo con la mayor parte de los miembros de este complejo. Como describimos en el apartado 7 de Resultados (segunda parte), los genes *sin3a*, *ing1* y *sap130* podrían actuar como represores de *emc*, ya que la disminución de sus niveles produjo un rescate del fenotipo de falta de función de *emc* en el ala. En cambio, los genes *emc*, *rp3* y *lid* podrían ser activadores de *emc*, dado que la disminución de sus niveles aumentó el fenotipo de falta de función de *emc*. Si bien nuestros resultados sugieren que Emc podría necesitar del complejo Sin3A para controlar la proliferación en el ala, otra posible interpretación a estos resultados sería que Emc fuese necesario para el correcto funcionamiento de este complejo, de modo que actuase como modulador de las funciones del mismo. Para esclarecer cuál de estas opciones es la correcta, sería necesario definir si cambios en los niveles de *emc* son capaces de afectar la actividad del complejo como modificador del estado de acetilación de la cromatina. Por otro lado, se ha descrito que la proteína bHLH de *Drosophila* Mad funciona como represor transcripcional gracias a su asociación con el complejo Sin3A (Ayer *et al.*, 1995; Alland *et al.*, 1997; Laherty *et al.*, 1997). Es posible, por tanto, que otras proteínas de la familia se sirvan de este complejo para funcionar como represores de la transcripción.

Emc controla la actividad de diversos factores de transcripción, regulando así la expresión de distintos genes diana. Nuestros resultados sugieren que además podría ejercer otro nivel de control transcripcional, a través de su interacción con modificadores de la cromatina (como los integrantes del complejo Sin3A/Rpd3), que inducen cambios epigenéticos en la misma. Serán necesarios futuros experimentos que esclarezcan esta posibilidad, ya que este mecanismo podría tener influencia sobre la decisión de las células de salir del ciclo y comenzar la diferenciación.

Conclusiones

1. *Emc* es necesario para la proliferación de las células del disco imaginal de ala. Su eliminación provoca el aumento de la duración del ciclo celular y la acumulación de células en la fase G2.
2. La muerte celular no tiene un papel relevante en los fenotipos causados por la falta de función de *emc*.
3. *Emc* regula negativamente la actividad de *Daughterless* en el ala. En condiciones de falta de función de *emc* se produce un aumento de la función de *Daughterless*, que es responsable de la mayoría de los defectos en la proliferación observados cuando falta *emc*.
4. Un aumento de la expresión de *daughterless* mimetiza los defectos proliferativos observados para la falta de función de *emc*, ocasionando la acumulación de células en la fase G2 del ciclo.
5. *Daughterless* es un regulador transcripcional negativo de la fosfatasa *cdc25 (string)*, ya que se une a distintas regiones reguladoras dentro de su promotor, reprimiendo de forma directa su expresión. Este mecanismo es responsable de los defectos en la progresión del ciclo celular observados en condiciones de falta de función de *emc* o de ganancia de función de *daughteless*.
6. La región promotora mínima de *string* contiene un elemento de regulación negativo, que reprime la expresión de *string* en los discos imaginales durante el desarrollo larvario.
7. Las proteínas bHLH *Ac-Sc* y *E(spl)* no están implicados en el control de la proliferación que ejerce *Da* durante el desarrollo del ala.
8. *emc* es un gen diana de la ruta de señalización de Notch. El aumento de expresión de *Emc* que se produce cuando se activa esta vía es responsable, al menos en parte, de la formación de sobre-crecimientos que produce la activación de Notch durante el desarrollo del ala.
9. El producto del gen *CG34422* interacciona genética y molecularmente con *Emc* durante el desarrollo del ala. El gen *CG34422* promueve la proliferación celular en el ala y, junto con *emc*, podría estar controlando la duración del ciclo celular.
10. *emc* interacciona genéticamente con el complejo modificador de la cromatina *Sin3A/Rpd3*, del cual forma parte el gen *CG34422*. Este complejo podría mediar alguna de las funciones de *Emc* durante el desarrollo.

Bibliografía

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., Venter, J.C. *et al*, 2000.** The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Aldaz, S., Escudero, L.M., Freeman, M., 2013.** Dual role of myosin II during *Drosophila* imaginal disc metamorphosis. *Nat Commun* 4, 1761.
- Alifragis, P., Poortinga, G., Parkhurst, S.M., Delidakis, C., 1997.** A network of interacting transcriptional regulators involved in *Drosophila* neural fate specification revealed by the yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13099-13104.
- Alland L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., DePinho, R.A., 1997.** Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 387, 49-55.
- Alonso, M.C., Cabrera, C.V., 1988.** The *achaeta-scute* gene complex of *Drosophila melanogaster* comprises four homologous genes. *EMBO J.* 7, 2585-2591.
- Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A., Walker, M.D., 1993a.** Cell-specific expression of helix-loop-helix transcription factors encoded by the E2A gene. *Nucleic Acids Res* 21, 1601-1606.
- Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A., Walker, M.D., 1993b.** The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8063-8067.
- Atchley, W.R., Fitch, W.M., 1997.** A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5172-5176.
- Ayer, D., Kretzner, L., Eisenman, R.N., 1993.** Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211-222.
- Ayer, D., Lawrence, Q., Eisenman, R.N., 1995.** Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* 80:767–776.
- Baonza, A., de Celis, J.F., García-Bellido, A., 2000.** Relationships between *extramacrochaetae* and Notch signalling in *Drosophila* wing development. *Development* 127, 2383-2393.
- Baonza, A., Freeman, M., 2001.** Notch signalling and the initiation of neural development in the *Drosophila* eye. *Development* 128, 3889-3898.
- Baonza, A., García-Bellido, A., 1999.** Dual role of *extramacrochaetae* in cell proliferation and cell differentiation during wing morphogenesis in *Drosophila*. *Mech Dev* 80, 133-146.
- Baonza, A., García-Bellido, A., 2000.** Notch signaling directly controls cell proliferation in the *Drosophila* wing disc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2609-2614.
- Baonza, A., Murawsky, C.M., Travers, A.A., Freeman, M., 2002.** Pointed and Tramtrack69 establish an EGFR-dependent transcriptional switch to regulate mitosis. *Nat Cell Biol* 4, 976-980.

- Basler, K., Struhl, G., 1994.** Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* 368, 208-214.
- Bate, M., 1993.** The mesoderm and its derivatives in the development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., Weintraub, H., 1990.** The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61, 49-59.
- Bhattacharya, A., Baker, N.E., 2012.** The role of the bHLH protein hairy in morphogenetic furrow progression in the developing *Drosophila* eye. *PLoS One* 7, e47503.
- Bier, E., Vaessin, H., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1992.** *deadpan*, an essential pan-neural gene in *Drosophila*, encodes a helix-loop-helix protein similar to the *hairy* gene product. *Genes Dev* 6, 2137-2151.
- Binda, O., Roy, J.S., Branton, P.E., 2006.** RBP1 family proteins exhibit SUMOylation-dependent transcriptional repression and induce cell growth inhibition reminiscent of senescence. *Mol Cell Biol* 26, 1917-1931.
- Blackwood, E.M., Eisenman, R.N., 1991.** Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-1217.
- Blair, S.S., 1995.** Compartments and appendage development in *Drosophila*. *Bioessays* 17, 299-309.
- Botas, J., Moscoso del Prado, J., García-Bellido, A., 1982.** Gene-dose titration analysis in the search of trans-regulatory genes in *Drosophila*. *EMBO J* 1, 307-310.
- Brand, A.H., Perrimon, N., 1993.** Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Bray, S.J., 2006.** Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678-689.
- Brown, N.L., Paddock, S.W., Sattler, C.A., Cronmiller, C., Thomas, B.J., Carroll, S.B., 1996.** *daughterless* is required for *Drosophila* photoreceptor cell determination, eye morphogenesis, and cell cycle progression. *Dev Biol* 179, 65-78.
- Brown, N.L., Sattler, C.A., Paddock, S.W., Carroll, S.B., 1995.** Hairy and Emc negatively regulate morphogenetic furrow progression in the *Drosophila* eye. *Cell* 80, 879-887.
- Cabrera, C.V., Alonso, M.C., 1991.** Transcriptional activation by heterodimers of the *achaete-scute* and *daughterless* gene products of *Drosophila*. *EMBO J* 10, 2965-2973.
- Cai, L., Morrow, E.M., Cepko, C.L., 2000.** Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival. *Development* 127, 3021-3030.

- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S., Morata, G., 1996.** Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* 274, 252-255.
- Campuzano, S., 2001.** Emc, a negative HLH regulator with multiple functions in *Drosophila* development. *Oncogene* 20, 8299-8307.
- Campuzano, S., Carramolino, L., Cabrera, C.V., Ruiz-Gómez, M., Villares, R., Boronat, A., Modolell, J., 1985.** Molecular genetics of the *achaete-scute* gene complex of *D. melanogaster*. *Cell* 40, 327-338.
- Cao, J., Gao, T., Giuliano, A.E., Irie, R.F., 1999.** Recognition of an epitope of a breast cancer antigen by human antibody. *Breast Cancer Res Treat* 53, 279-290.
- Cao, J., Gao, T., Stanbridge, E.J., Irie, R., 2001.** RBP1L1, a retinoblastoma-binding protein-related gene encoding an antigenic epitope abundantly expressed in human carcinomas and normal testis. *J Natl Cancer Inst* 93, 1159-1165.
- Castanon, I., Von Stetina, S., Kass, J., Baylies, M.K., 2001.** Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during *Drosophila* mesoderm development. *Development* 128, 3145-3159.
- Caudy, M., Grell, E.H., Dambly-Chaudiere, C., Ghysen, A., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1988a.** The maternal sex determination gene daughterless has zygotic activity necessary for the formation of peripheral neurons in *Drosophila*. *Genes Dev* 2, 843-852.
- Caudy, M., Vässin, H., Brand, M., Tuma, R., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1988b.** *daughterless*, a *Drosophila* gene essential for both neurogenesis and sex determination, has sequence similarities to *myc* and the *achaete-scute* complex. *Cell* 55, 1061-1067.
- Chen, C.K., Chien, C.T., 1999.** Negative regulation of *atonal* in proneural cluster formation of *Drosophila* R8 photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5055-5060.
- Chen, G., Fernyez, J., Mische, S., Courey, A.J., 1999.** A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 y the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* 13, 2218-2230.
- Cline, T.W., 1976.** A sex-specific, temperature-sensitive maternal effect of the *daughterless* mutation of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 84, 723-742.
- Cline, T.W., 1983.** The interaction between *daughterless* and *sex-lethal* in triploids: a lethal sex-transforming maternal effect linking sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 95, 260-274.
- Cohen, B., MacGuffin, M.E., Pfeifle, C., Segal, D., Cohen, S.M., 1992.** *apterous*: a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes & Dev* 6, 715-729.

- Cohen, B., Simcox, A.A., Cohen, S.M., 1993.** Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development* 117, 597-608.
- Cohen, S.M., 1993.** The development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Coqueret, O., 2002.** Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299, 35-55.
- Couso, J.P., Knust, E., Martinez Arias, A., 1995.** Serrate and Wingless cooperate to induce *vestigial* gene expression and wing formation in *Drosophila*. *Curr Biol* 5, 1437-1448.
- Couso, J.P., Martinez Arias, A., 1994.** Notch is required for wingless signalling in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 79, 259-272.
- Cowley, S.M., Iritani, B.M., Mendrysa, S.M., Xu, T., Cheng, P.F., Yada, J., Liggitt, H.D., Eisenman, R.N., 2005.** The mSin3A chromatin-modifying complex is essential for embryogenesis and T-cell development. *Mol Cell Biol* 25, 6990-7004.
- Crews, S.T., 1998.** Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev* 12, 607-620.
- Crick, F.H.C., Lawrence, P.A., 1975.** Compartments and polyclones in insect development. *Science* 189, 340-347.
- Cronmiller, C., Cline, T.W., 1987.** The *Drosophila* sex determination gene *daughterless* has different functions in the germ line versus the soma. *Cell* 48, 479-487.
- Cruz, C., Glavic, A., Casado, M., de Celis, J.F., 2009.** A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the *Drosophila melanogaster* wing. *Genetics* 183, 1005-1026.
- Cubas, P., de Celis, J.F., Campuzano, S., Modolell, J., 1991.** Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes & Dev.* 5, 996-1008.
- Cubas, P., Modolell, J., 1992.** The *extramacrochaetae* gene provides information for sensory organ patterning. *EMBO J.* 9, 3385-3393.
- Cubas, P., Modollel, J., Ruiz-Gómez, M., 1994.** The helix-loop-helix *extramacrochaetae* protein is required for proper specification of many cell types in the *Drosophila* embryo. *Development* 120, 2555-2565.
- Cummings, C.A., Cronmiller, C., 1994.** The *daughterless* gene functions together with Notch and Delta in the control of ovarian follicle development in *Drosophila*. *Development* 120, 381-394.
- Dambly-Chaudière, C., Ghysen, A., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1988.** The determination of sense organs in *Drosophila*: interaction of *scute* with *daughterless*. *Roux's Arch. Dev. Biol*, 419-423.

- Dannenberger, J.H., David, G., Zhong, S., van der Torre, J., Wong, W.H., Depinho, R.A., 2005.** mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes Dev* 19, 1581-1595.
- Das, T.K., Sangodkar, J., Negre, N., Narla, G., Cagan, R.L., 2013.** Sin3a acts through a multi-gene module to regulate invasion in *Drosophila* and human tumors. *Oncogene* 32, 3184-3197.
- Datar, S.A., Jacobs, H.W., de la Cruz, A.F., Lehner, C.F., Edgar, B.A., 2000.** The *Drosophila* cyclin D-Cdk4 complex promotes cellular growth. *EMBO J* 19, 4543-4554.
- David, G., Grynetti, K.B., Finnerty, P.M., Simpson, N., Chu, G.C., Depinho, R.A., 2008.** Specific requirement of the chromatin modifier mSin3B in cell cycle exit and cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4168-4172.
- de Celis, J.F., Baonza, A., García-Bellido, A., 1995.** Behavior of *extramacrochaetae* mutant cells in the morphogenesis of the *Drosophila* wing. *Mech Dev* 53, 209-221.
- de Celis, J.F., García-Bellido, A., 1994.** Roles of the *Notch* gene in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mech. Dev.* 46, 109-122.
- de Nooij, J.C., Letendre, M.A., Hariharan, I.K., 1996.** A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* 87, 1237-1247.
- Díaz-Benjumea, F.J., Cohen, S.M., 1995.** *Serrate* signals through *Notch* to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* 121, 4215-4225.
- Dick, F.A., Rubin, S.M., 2013.** Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 297-306.
- Domínguez, M., Campuzano, S., 1993.** *asense*, a member of the *Drosophila achaete-scute* complex, is a proneural and neural differentiation gene. *EMBO J.* 12, 2049-2060.
- Donner, A.L., Maas, R.L., 2004.** Conservation and non-conservation of genetic pathways in eye specification. *Int J Dev Biol* 48, 743-753.
- Du, W., Dyson, N., 1999.** The role of RBF in the introduction of G1 regulation during *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J* 18, 916-925.
- Dunphy, W.G., Kumagai, A., 1991.** The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* 67, 189-196.
- Duronio, R.J., Bonnette, P.C., O'Farrell, P.H., 1998.** Mutations of the *Drosophila dDP*, *dE2F*, and *cyclin E* genes reveal distinct roles for the E2F-DP transcription factor and cyclin E during the G1-S transition. *Mol Cell Biol* 18, 141-151.

- Duronio, R.J., O'Farrell, P.H., Xie, J.E., Brook, A., Dyson, N., 1995.** The transcription factor E2F is required for S phase during Drosophila embryogenesis. *Genes Dev* 9, 1445-1455.
- Edgar, B.A., Datar, S.A., 1996.** Zygotic degradation of two maternal Cdc25 mRNAs terminates Drosophila's early cell cycle program. *Genes Dev* 10, 1966-1977.
- Edgar, B.A., Lehman, D.A., O'Farrell, P.H., 1994.** Transcriptional regulation of *string* (cdc25): a link between developmental programming and the cell cycle. *Development* 120, 3131-3143.
- Edgar, B.A., O'Farrell, P.H., 1989.** Genetic control of cell division patterns in the Drosophila embryo. *Cell* 57, 177-187.
- Edgar, B.A., Sprenger, F., Duronio, R.J., Leopold, P., O'Farrell, P.H., 1994.** Distinct molecular mechanism regulate cell cycle timing at successive stages of Drosophila embryogenesis. *Genes Dev* 8, 440-452.
- Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., Harrison, S.C., 1994.** Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* 8, 970-980.
- Ellis, H.M., 1994.** Embryonic expression and function of the Drosophila helix-loop-helix gene, *extramacrochaetae*. *Mech Dev* 47, 65-72.
- Ellis, H.M., Spann, D.R., Posakony, J.W., 1990.** *extramacrochaetae*, a negative regulator of sensory organ development in Drosophila, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* 61, 27-38.
- Engel, I., Murre, C., 2004.** E2A proteins enforce a proliferation checkpoint in developing thymocytes. *EMBO J* 23, 202-211.
- Fain, M.J., Stevens, B., 1982.** Alterations in the cell cycle of Drosophila imaginal disc cells precede metamorphosis. *Dev Biol* 92, 247-258.
- Fattaey, A.R., Helin, K., Dembski, M.S., Dyson, N., Harlow, E., Vuocolo, G.A., Hanobik, M.G., Haskell, K.M., Oliff, A., Defeo-Jones, D., et al., 1993.** Characterization of the retinoblastoma binding proteins RBP1 y RBP2. *Oncogene* 8, 3149-3156.
- Firth, L.C., Baker, N.E., 2005.** Extracellular signals responsible for spatially regulated proliferation in the differentiating Drosophila eye. *Dev Cell* 8, 541-551.
- Fisher, A.L., Caudy, M., 1998.** Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev* 12, 1931-1940.
- Fleischer, T.C., Yun, U.J., Ayer, D.E., 2003.** Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex. *Mol Cell Biol* 23, 3456-3467.
- Fong, S., Debs, R.J., Desprez, P.Y., 2004.** Id genes and proteins as promising targets in cancer therapy. *Trends Mol Med* 10, 387-392.

- Fristrom, D., Fristrom, J.W., 1993.** The metamorphic development of the adult epidermis., in: Bate, M., Martinez-Arias, A. (Eds.), The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold spring harbor laboratory press.
- Funato, N., Ohtani, K., Ohyama, K., Kuroda, T., Nakamura, M., 2001.** Common regulation of growth arrest and differentiation of osteoblasts by helix-loop-helix factors. *Mol Cell Biol* 21, 7416-7428.
- García-Alonso, L., García-Bellido, A., 1988.** *extramacrochaetae*, a trans-acting gene of the *achaete-scute* complex of *Drosophila* is involved in cell communication. *Roux's Arch. Dev. Biol* 197, 328-338.
- García-Bellido, A., 1975.** Genetic control of wing disc development in *Drosophila*, in: Porter, R., Rivers, J. (Eds.), Cell patterning. CIBA Symposium, Boston, pp. 161-183.
- García-Bellido, A., Merriam, J.R., 1971.** Genetic analysis of cell heredity in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 2222-2226.
- García-Bellido, A., Ripoll, P., Morata, G., 1976.** Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 48, 132-147.
- García-Bellido, A., Ripoll, P., Morata, G., 1973.** Developmental compartmentalization of the wing disc of *Drosophila*. *Nature New Biol.* 245, 251-253.
- Garrell, J., Campuzano, S., 1991.** The helix-loop-helix domain: a common motif for bristles, muscles and sex. *Bioessays* 13, 493-498.
- Garrell, J., Modolell, J., 1990.** The *Drosophila extramacrochaetae* locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell* 61, 39-48.
- Gergen, J.P., 1987.** Dosage Compensation in *Drosophila*: Evidence That *daughterless* and *Sex-lethal* Control X Chromosome Activity at the Blastoderm Stage of Embryogenesis. *Genetics* 117, 477-485.
- Giraldez, A.J., Cohen, S.M., 2003.** Wingless and Notch signaling provide cell survival cues and control cell proliferation during wing development. *Development* 130, 6533-6543.
- Go, J.M., Eastman, D.S., Artavanis-Tsakonas, S., 1998.** Cell proliferation control by *Notch* signaling in *Drosophila* development. *Development* 125, 2031-2040.
- González, F., Romani, S., Cubas, P., Modolell, J., Campuzano, S., 1989.** Molecular analysis of the *asense* gene, a member of the *achaete-scute* complex of *Drosophila melanogaster*, and its novel role in optic lobe development. *EMBO J.* 8, 3553-3562.
- Gregory, S.L., Kortschak, R.D., Kalionis, B., Saint, R., 1996.** Characterization of the dead ringer gene identifies a novel, highly conserved family of sequence-specific DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 16, 792-799.

- Hacker, C., Kirsch, R.D., Ju, X.S., Hieronymus, T., Gust, T.C., Kuhl, C., Jorgas, T., Kurz, S.M., Rose-John, S., Yokota, Y., Zenke, M., 2003.** Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol* 4, 380-386.
- Hara, E., Yamaguchi, T., Nojima, H., Ide, T., Campisi, J., Okayama, H., Oda, K., 1994.** Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J Biol Chem* 269, 2139-2145.
- Hartenstein, V., Posakony, J.W., 1989.** Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* 107, 389-405.
- Hassan, B., Vaessin, H., 1997.** Daughterless is required for the expression of cell cycle genes in peripheral nervous system precursors of *Drosophila* embryos. *Dev Genet* 21, 117-122.
- Henthorn, P., McCarrick-Walmsley, R., Kadesch, T., 1990.** Sequence of the cDNA encoding ITF-1, a positive-acting transcription factor. *Nucleic Acids Res* 18, 677.
- Henthorn, P.S., Stewart, C.C., Kadesch, T., Puck, J.M., 1991.** The gene encoding human TFE3, a transcription factor that binds the immunoglobulin heavy-chain enhancer, maps to Xp11.22. *Genomics* 11, 374-378.
- Hing, H.K., Sun, X., Artavanis-Tsakonas, S., 1994.** Modulation of wingless signaling by Notch in *Drosophila*. *Mech.Dev.* 47, 261-268.
- Homma, M.K., Homma, Y., 2008.** Cell cycle and activation of CK2. *Mol Cell Biochem* 316, 49-55.
- Iavarone, A., Garg, P., Lasorella, A., Hsu, J., Israel, M.A., 1994.** The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev* 8, 1270-1284.
- Iavarone, A., Lasorella, A., 2006.** ID proteins as targets in cancer and tools in neurobiology. *Trends Mol Med* 12, 588-594.
- Jafar-Nejad, H., Tien, A.C., Acar, M., Bellen, H.J., 2006.** Senseless and Daughterless confer neuronal identity to epithelial cells in the *Drosophila* wing margin. *Development* 133, 1683-1692.
- Jan, Y.N., Jan, L.Y., 1994.** Genetic control of cell fate specification in *Drosophila* peripheral nervous system. *Annual Review of Genetics* 28, 373-393.
- Jarman, A.P., Brand, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1993.** The regulation and function of the helix-loop-helix gene, *asense*, in *Drosophila* neural precursors. *Development* 119, 19-29.
- Jarman, A.P., Grell, E.H., Ackerman, L., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1994.** *atonal* is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature* 369, 398-400.
- Johnston, L.A., Edgar, B.A., 1998.** Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* 394, 82-84.

- Kapuy, O., He, E., Uhlmann, F., Novak, B., 2009.** Mitotic exit in mammalian cells. *Mol Syst Biol* 5, 324.
- Kennison, J.A., Tamkun, J.W., 1988.** Dosage-dependent modifiers of *polycomb* and *antennapedia* mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8136-8140.
- Klamt, C., Knust, E., Tietze, K., Campos-Ortega, J.A., 1989.** Closely related transcripts encoded by the neurogenic gene complex *enhancer of split* of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 8, 203-210.
- Knoblich, J.A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R., Lehner, C.F., 1994.** Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 77, 107-120.
- Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P., Simon, M., 1985.** The *engrailed* locus of *Drosophila*, *In situ* localization of transcripts reveals compartment specific expression. *Cell* 40, 45-53.
- Kortschak, R.D., Tucker, P.W., Saint, R., 2000.** ARID proteins come in from the desert. *Trends Biochem Sci* 25, 294-299.
- Lai, A., Kennedy, B.K., Barbie, D.A., Bertos, N.R., Yang, X.J., Theberge, M.C., Tsai, S.C., Seto, E., Zhang, Y., Kuzmichev, A., Lane, W.S., Reinberg, D., Harlow, E., Branton, P.E., 2001.** RBP1 recruits the mSIN3-histone deacetylase complex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest. *Mol Cell Biol* 21, 2918-2932.
- Laherty, C. D., Yang, W. M., Sun, J. M., Davie, J. R., Seto, E., Eisenman, R. N., 1997.** Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89:349–356.
- Lasorella, A., Boldrini, R., Dominici, C., Donfrancesco, A., Yokota, Y., Inserra, A., Iavarone, A., 2002.** Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of N-myc in human neuroblastoma. *Cancer Res* 62, 301-306.
- Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y., Iavarone, A., 2000.** Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* 407, 592-598.
- Lasorella, A., Uo, T., Iavarone, A., 2001.** Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene* 20, 8326-8333.
- Lawrence, P.A., Sanson, B., Vincent, J.-P., 1996.** Compartments, *wingless* and *engrailed*: patterning the ventral epidermis of *Drosophila* embryos. *Development* 122, 4095-4103.
- Lee, J.E., Hollenberg, S.M., Snider, L., Turner, D.L., Lipnick, N., Weintraub, H., 1995.** Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844.
- Lee, L.A., Orr-Weaver, T.L., 2003.** Regulation of cell cycles in *Drosophila* development: intrinsic and extrinsic cues. *Annu Rev Genet* 37, 545-578.

- Lee, T., Luo, L., 1999.** Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* 22, 451-461.
- Lehman, D.A., Patterson, B., Johnston, L.A., Balzer, T., Britton, J.S., Saint, R., Edgar, B.A., 1999.** Cis-regulatory elements of the mitotic regulator, *string/Cdc25*. *Development* 126, 1793-1803.
- Lewis I. Held Jr., 2005.** Imaginal Discs: The Genetic and Cellular Logic of Pattern Formation. Cambridge University Press.
- Lucchesi, J.C., Skripsky, T., 1981.** The link between dosage compensation and sex differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 82, 217-227.
- Lyden, D., Young, A.Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B.L., Hynes, R.O., Zhuang, Y., Manova, K., Benezra, R., 1999.** Id1 y Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 401, 670-677.
- Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H., Pabo, C.O., 1994.** Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 77, 451-459.
- Ma, Q., Kintner, C., Yerson, D.J., 1996.** Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.
- Markus, M., Du, Z., Benezra, R., 2002.** Enhancer-specific modulation of E protein activity. *J Biol Chem* 277, 6469-6477.
- Massari, M.E., Murre, C., 2000.** Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20, 429-440.
- Meyer, C.A., Jacobs, H.W., Datar, S.A., Du, W., Edgar, B.A., Lehner, C.F., 2000.** *Drosophila* Cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression. *EMBO J* 19, 4533-4542.
- Milán, M., Campuzano, S., García-Bellido, A., 1996.** Cell cycling and patterned cell proliferation in the *Drosophila* wing during metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11687-11692.
- Mirth, C.K., Truman, J.W., Riddiford, L.M., 2009.** The ecdysone receptor controls the post-critical weight switch to nutrition-independent differentiation in *Drosophila* wing imaginal discs. *Development*, 136, 2345-2353.
- Murre, C., McCaw, P.S., Baltimore, D., 1989a.** A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, Daughterless, MyoD, and Myc proteins. *Cell* 56, 777-783.
- Murre, C., McCaw, P.S., Väsín, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H., Baltimore, D., 1989b.** Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.

- Naya, F.J., Stellrecht, C.M., Tsai, M.J., 1995.** Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* 9, 1009-1019.
- Negre, N., Brown, C.D., Ma, L., Bristow, C.A., Miller, S.W., White, K.P., *et al.* 2011.** A cis-regulatory map of the *Drosophila* genome. *Nature* 471, 527-531.
- Neufeld, T.P., de la Cruz, A.F., Johnston, L.A., Edgar, B.A., 1998a.** Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 93, 1183-1193.
- Neufeld, T.P., Tang, A.H., Rubin, G.M., 1998b.** A genetic screen to identify components of the *sina* signaling pathway in *Drosophila* eye development. *Genetics* 148, 277-286.
- Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Rink, L., Malecki, M., Kossev, P., Wasik, M.A., Skorski, T., 2006.** Id1 transcription inhibitor-matrix metalloproteinase 9 axis enhances invasiveness of the breakpoint cluster region/abelson tyrosine kinase-transformed leukemia cells. *Cancer Res* 66, 4108-4116.
- O'Brochta, D.A., Bryant, P.J., 1985.** A zone of non-proliferating cells at a lineage restriction boundary in *Drosophila*. *Nature* 313, 138-141.
- Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I., Caudy, M., 1994.** Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev* 8, 2743-2755.
- Olson, E.N., 1990.** MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev* 4, 1454-1461.
- Pastor-Pareja, J.C., Grawe, F., Martín-Blanco, E., García-Bellido, A., 2004.** Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev Cell* 7, 387-399.
- Perk, J., Iavarone, A., Benezra, R., 2005.** Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 603-614.
- Peters, J.M., 2002.** The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis y beyond. *Mol Cell* 9, 931-943.
- Peverali, F.A., Ramqvist, T., Saffrich, R., Pepperkok, R., Barone, M.V., Philipson, L., 1994.** Regulation of G1 progression by E2A y Id helix-loop-helix proteins. *EMBO J* 13, 4291-4301.
- Phillips, R.G., Whittle, J.R., 1993.** *wingless* expression mediates determination of peripheral nervous system elements in late stages of *Drosophila* wing disc development. *Development* 118, 427-438.
- Pile, L.A., Schlag, E.M., Wassarman, D.A., 2002.** The SIN3/RPD3 deacetylase complex is essential for G(2) phase cell cycle progression and regulation of SMRTER corepressor levels. *Mol Cell Biol* 22, 4965-4976.
- Ponton, F., Chapuis, M.P., Pernice, M., Sword, G.A., Simpson, S.J., 2011.** Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 57, 840-850.

- Popova, M.K., He, W., Korenjak, M., Dyson, N.J., Moon, N.S., 2011.** Rb deficiency during *Drosophila* eye development deregulates EMC, causing defects in the development of photoreceptors and cone cells. *J Cell Sci* 124, 4203-4212.
- Raftery, L.A., Sanicola, M., Blackman, R.K., Gelbart, W.M., 1991.** The relationships of *decapentaplegic* and *engrailed* expression in *Drosophila* imaginal discs: do these genes mark the anterior-posterior compartment boundary? *Development* 113, 27-33.
- Reichert, H., 2002.** Conserved genetic mechanisms for embryonic brain patterning. *Int J Dev Biol* 46, 81-87.
- Reis, T., Edgar, B.A., 2004.** Negative regulation of dE2F1 by cyclin-dependent kinases controls cell cycle timing. *Cell* 117, 253-264.
- Richardson, H.E., O'Keefe, L.V., Reed, S.I., Saint, R., 1993.** A *Drosophila* G1-specific cyclin E homolog exhibits different modes of expression during embryogenesis. *Development* 119, 673-690.
- Roberts, E.C., Deed, R.W., Inoue, T., Norton, J.D., Sharrocks, A.D., 2001.** Id helix-loop-helix proteins antagonize pax transcription factor activity by inhibiting DNA binding. *Mol Cell Biol* 21, 524-533.
- Romani, S., Campuzano, S., Macagno, E.R., Modolell, J., 1989.** Expression of *achaete* y *scute* genes in *Drosophila* imaginal discs and their function in sensory organ development. *Genes & Development* 3, 997-1007.
- Rothschild, G., Zhao, X., Iavarone, A., Lasorella, A., 2006.** E Proteins and Id2 converge on p57Kip2 to regulate cell cycle in neural cells. *Mol Cell Biol* 26, 4351-4361.
- Rulifson, E.J., Blair, S.S., 1995.** *Notch* regulates *wingless* expression and is not required for the reception of paracrine wingless signals during wing margin development in *Drosophila*. *Development* 121, 2813-2824.
- Rushlow, C.A., Hogan, A., Pinchin, S.M., Howe, K.M., Lardelli, M., Ish-Horowicz, D., 1989.** The *Drosophila* hairy protein acts in both segmentation and bristle patterning and shows homology to N-myc. *EMBO J* 8, 3095-3103.
- Sambasivan, R., Pavlath, G.K., Dhawan, J., 2008.** A gene-trap strategy identifies quiescence-induced genes in synchronized myoblasts. *J Biosci* 33, 27-44.
- San Juan, B.P., Andrade-Zapata, I., Baonza, A., 2012.** The bHLH factors Dpn and members of the E(spl) complex mediate the function of Notch signalling regulating cell proliferation during wing disc development. *Biol Open* 1, 667-676.
- Sandmann, T., Jakobsen, J.S., Furlong, E.E., 2006.** ChIP-on-chip protocol for genome-wide analysis of transcription factor binding in *Drosophila melanogaster* embryos. *Nat Protoc* 1, 2839-2855.

- Schreiber-Agus, N., Chin, L., Chen, K., Torres, R., Rao, G., Guida, P., Skoultchi, A.I., DePinho, R.A., 1995.** An amino-terminal domain of Mxi1 mediates anti-Myc oncogenic activity and interacts with a homolog of the yeast transcriptional repressor SIN3. *Cell* 80, 777-786.
- Secombe, J., Li, L., Carlos, L., Eisenman, R.N., 2007.** The Trithorax group protein Lid is a trimethyl histone H3K4 demethylase required for dMyc-induced cell growth. *Genes Dev* 21, 537-551.
- Shyala, T., Kortschak, R.D., Gregory, S., Saint, R., 1999.** The *Drosophila dead ringer* gene is required for early embryonic patterning through regulation of *argos* and *buttonhead* expression. *Development* 126, 4341-4349.
- Shulman, J.M., Shulman, L.M., Weiner, W.J., Feany, M.B., 2003.** From fruit fly to bedside: translating lessons from *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurol* 16, 443-449.
- Simpson, P., Morata, G., 1981.** Differential mitotic rates and patterns of growth in the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* 85, 299-308.
- Skeath, J.B., Carroll, S.B., 1991.** Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev* 5, 984-995.
- Song, S., Cooperman, J., Letting, D.L., Blobel, G.A., Choi, J.K., 2004.** Identification of *cyclin D3* as a direct target of E2A using DamID. *Mol Cell Biol* 24, 8790-8802.
- Spain, M.M., Caruso, J.A., Swaminathan, A., Pile, L.A., 2010.** *Drosophila* SIN3 isoforms interact with distinct proteins and have unique biological functions. *J Biol Chem* 285, 27457-27467.
- Spicer, D.B., Rhee, J., Cheung, W.L., Lassar, A.B., 1996.** Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* 272, 1476-1480.
- St-Denis, N.A., Litchfield, D.W., 2009.** Protein kinase CK2 in health and disease: From birth to death: the role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cell Mol Life Sci* 66, 1817-1829.
- Suryadinata, R., Sadowski, M., Steel, R., Sarcevic, B., 2011.** Cyclin-dependent kinase-mediated phosphorylation of RBP1 and pRb promotes their dissociation to mediate release of the SAP30. mSin3.HDAC transcriptional repressor complex. *J Biol Chem* 286, 5108-5118.
- Swaminathan, A., Barnes, V.L., Fox, S., Gammouh, S., Pile, L.A., 2012.** Identification of genetic suppressors of the Sin3A knockdown wing phenotype. *PLoS One* 7, e49563.
- Swaminathan, A., Pile, L.A., 2010.** Regulation of cell proliferation y wing development by *Drosophila* SIN3 and String. *Mech Dev* 127, 96-106.
- Takeuchi, T., Yamazaki, Y., Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Kondo, S., Motoyama, J., Higashinakagawa, T., 1995.** Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev* 9, 1211-1222.

- Taylor-Harding, B., Binne, U.K., Korenjak, M., Brehm, A., Dyson, N.J., 2004.** p55, the *Drosophila* ortholog of RbAp46/RbAp48, is required for the repression of dE2F2/RBF-regulated genes. *Mol Cell Biol* 24, 9124-9136.
- Tsuchiya, T., Okaji, Y., Tsuno, N.H., Sakurai, D., Tsuchiya, N., Kawai, K., Yazawa, K., Asakage, M., Yamada, J., Yoneyama, S., Kitayama, J., Osada, T., Watanabe, T., Tokunaga, K., Takahashi, K., Nagawa, H., 2005.** Targeting Id1 and Id3 inhibits peritoneal metastasis of gastric cancer. *Cancer Sci* 96, 784-790.
- Vaessin, H., Brand, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1994.** *daughterless* is essential for neuronal precursor differentiation but not for initiation of neuronal precursor formation in *Drosophila* embryo. *Development* 120, 935-945.
- Van Doren, M., Ellis, H.M., Posakony, J.W., 1991.** The *Drosophila* *extramacrochaetae* protein antagonizes sequence-specific DNA binding by *daughterless/achaete-scute* protein complexes. *Development* 113, 245-255.
- Van Doren, M., Powell, P.A., Pasternak, D., Singson, A., Posakony, J.W., 1992.** Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross-activation of *achaete* is antagonized by *extramacrochaetae*. *Genes Dev* 6, 2592-2605.
- Vázquez, M., Moore, L., Kennison, J.A., 1999.** The trithorax group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the *brahma* chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* 126, 733-742.
- Villares, R., Cabrera, C.V., 1987.** The *achaetae-scute* gene complex of *D. melanogaster*: Conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to *myc*. *Cell* 50, 415-424.
- Weintraub, H., Dwarki, V.J., Verma, I., Davis, R., Hollenberg, S., Snider, L., Lassar, A., Tapscott, S.J., 1991.** Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev* 5, 1377-1386.
- White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., Steller, H., 1994.** Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 264, 677-682.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jesell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., 1998.** Principles of Development. Oxford University Press.
- Wong, M.C., Castanon, I., Baylies, M.K., 2008.** Daughterless dictates Twist activity in a context-dependent manner during somatic myogenesis. *Dev Biol* 317, 417-429.
- Wu, M.Y., Eldin, K.W., Beaudet, A.L., 2008.** Identification of chromatin remodeling genes Arid4a and Arid4b as leukemia suppressor genes. *J Natl Cancer Inst* 100, 1247-1259.

- Yates, P.R., Atherton, G.T., Deed, R.W., Norton, J.D., Sharrocks, A.D., 1999.** Id helix-loop-helix proteins inhibit nucleoprotein complex formation by the TCF ETS-domain transcription factors. *EMBO J* 18, 968-976.
- Yokota, Y., 2001.** Id and development. *Oncogene* 20, 8290-8298.
- Yokota, Y., Mansouri, A., Mori, S., Sugawara, S., Adachi, S., Nishikawa, S., Gruss, P., 1999.** Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 397, 702-706.
- Younger-Shepherd, S., Vaessin, H., Bier, E., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1992.** *deadpan*, an essential pan-neural gene encoding an HLH protein, acts as a denominator in *Drosophila* sex determination. *Cell* 70, 911-922.
- Zecca, M., Basler, K., Struhl, G., 1995.** Sequential organizing activities of *engrailed*, *hedgehog* and *decapentaplegic* in the *Drosophila* wing. *Development* 121, 2265-2278.
- Zecca, M., Struhl, G., 2002.** Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* 129, 1357-1368.
- Zervos, A.S., Gyuris, J., Brent, R., 1994.** Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 79, following 388.
- Zhang, H.S., Dean, D.C., 2001.** Rb-mediated chromatin structure regulation and transcriptional repression. *Oncogene* 20, 3134-3138.
- Zhao, F., Vilardi, A., Neely, R.J., Choi, J.K., 2001.** Promotion of cell cycle progression by basic helix-loop-helix E2A. *Mol Cell Biol* 21, 6346-6357.
- Zhao, G.Q., Zhao, Q., Zhou, X., Mattei, M.G., de Crombrughe, B., 1993.** TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol Cell Biol* 13, 4505-4512.

Abreviaturas

‰: tanto por ciento

A: anterior

A/P: anterior/posterior

ac-sc: achaete-scute

ac: achaete

AcNa: acetato de sodio

act: actina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ap: apterous

ARID: “*AT Rich Interacting Domain*” (Dominio de Interacción Rico en regiones AT)

ARN: ácido ribonucleico

ARNi: ácido ribonucleico interferente

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BCIP: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate

bHLH: “*basic Helix Loop Helix*”

BSA: “*Bovine Serum Albumine*” (albúmina de suero bovino)

c.f.: concentración final

Cas3: Caspasa 3

ChIP-qPCR: “*Chromatin Immunoprecipitation and quantitative PCR*” (Inmunoprecipitación de Cromatina y PCR cuantitativa)

Codón STOP: codón de parada de la transcripción

Crom: cromosoma

CycA: Ciclina A

CycB: Ciclina B

CycD: Ciclina D

CycE: Ciclina E

D: dorsal

D/V: dorsal/ventral

Da: Daughterless

DEPC: diethyl pyrocarbonate

DFP: después de la formación del pupario

Diap: *Drosophila* “*inhibitor of apoptosis proteins*” (Proteínas inhibidoras de la apoptosis)

DOC: sodium deoxicholate

Dpp: Decapentaplegic

DTT: dithiothreitol

E. coli: Escherichia Coli

E(spl): Enhancer of Split

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

Emc: Extramacrochaetae

EMSA: “*Electrophoretic Mobility Shift Assay*”

en: *engrailed*

et al: y colaboradores

EtOH: etanol

F-act: F-actina

FACS: “*Fluorescence Activated Cell Sorting*”

fase M: mitosis

FBS: “*Fetal Bovine Serum*” (suero fetal bovino)

flp: “*flipase*”

GFP: “*Green fluorescent protein*” (proteína fluorescente verde)

Gro: Groucho

h: horas

H₂O miliQ: agua destilada doblemente autoclavada

H₂O: Agua destilada

HDAC: “*Histone Deacetylase*” (enzima deacetilasa de histonas)

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

Hh: Hedgehog

hs: “*heat shock*” (choque térmico)

Id: “*Inhibitor of Differentiation*” (inhibidores de la diferenciación)

IgG: inmunoglobulinas

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

Kb: kilo bases

KCl: cloruro de potasio

KDa: kilo dalton

l: litro

L1-L5: venas longitudinales 1-5

LB: Luria Bertani

LiCl: cloruro de litio

log: logaritmo

M: *Minute*

M: molar

MARCM: “*Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker*”

Met-S³⁵: metionina conjugada con azufre 35

mg: miligramo

MgCl₂: cloruro de magnesio

Min: minutos

ml: mililitro

mM: mili molar

mwh: “*multiple wing hair*”

N: Notch

n: número de casos analizados

N₂: nitrógeno líquido

NaCl: cloruro de sodio

NBT: 4-nitro blue tetrazolium chloride

ng: nanogramos

Ni, N^{intra}: *"Notch intracellular domain"* (dominio intracelular de Notch)

NP-40: nonidet-P-40

nub: nubbin

° C: grados centígrados

OFF: apagado

Oligos: oligonucleótidos

ON: encendido

P: posterior

pb: pares de bases

PBS: *"Phosphate Buffered Saline"* (tampón fosfato salino)

PCNA: *"Proliferating Cell Nuclear Antigen"* (antígeno nuclear de células en proliferación)

PCR: *"Polymerase Chain Reaction"* (reacción en cadena de la polimerasa)

PFA: paraformaldehído

PH3: Fosfo-Histona 3

PIPES: piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)

pRB: proteína del Retinoblastoma fosforilada

qPCR: *"quantitative PCR"* (PCR cuantitativa)

Rb: proteína del Retinoblastoma

RBP: *"Retinoblastoma Binding Protein"* (proteína de unión a Retinoblastoma)

Sal: Spalt

Sc: Scute

Seg: segundos

SSC: *"Saline Sodium Citrate buffer"* (Tampón Salino de Citrato de Sodio)

Stg: String

TAE: Tris-ácido acético-EDTA

TBE: Tris-borato-EDTA

TPH: tras la puesta del huevo

Tris-HCl: Tris-ácido clorhídrico

ts: termosensible

tub: tubulina

UAS: *"Upstream Activated Sequence"*

ubi: ubiquitina

V: ventral

v:v: relación volumen: volumen

VDRC: *"Vienna Drosophila RNAi Centre"*

Vf: volumen final

vg: *vestigial*

w: “white”

Wg: Wingless

y: “yellow”

ZNP: “Zone of Non Proliferating cells” (zona de no proliferación celular)

β-Gal: β-Galactosidasa

μg: microgramo

μl: microlitro

Agradecimientos

Hoy por fin llega el tan esperado día en el que pongo punto y final a la etapa de la Tesis. Ha sido duro y maravilloso a la vez ya que, detrás de momentos en los que sólo te sale gritar ¡voy a dejar la investigación!, siempre vienen otros con ilusiones y alegrías, que hoy hacen que me quede con la sensación de que todo esto ha merecido la pena. Pero sin lugar a dudas, lo que me ha hecho superar cada dificultad es el apoyo, en algunos casos diario y en otros más disperso pero presente, de un montón de personas, a las que quiero dedicarles unas palabras de gratitud.

Quiero empezar dándole las gracias a Antonio Baonza, mi director de Tesis, por ser un gran científico al que admiro y un estupendo compañero de trabajo con el que compartir el día a día. Gracias por confiar tanto en mí, por contagiarnos tu pasión por la ciencia y por tener siempre palabras de ánimo cuando las cosas se han puesto difíciles. Siempre estaré encantada de trabajar contigo.

Gracias a Jose, porque siempre has estado al pie del cañón cuando te he necesitado, transmitiéndome seguridad para afrontar cualquier dificultad. Gracias también por tus opiniones y críticas sinceras, que siempre me han resultado fundamentales para escoger el camino correcto a seguir. Espero que siempre estemos en contacto.

Gracias Sandra por ser la compañera más cariñosa y paciente que uno pueda desear. Eres el mejor ejemplo que puede haber de que para hacer las cosas bien no hace falta correr. Gracias por crear siempre tan buen ambiente a tu alrededor, trabajar a tu lado ha sido un auténtico placer. No saben la suerte que tienen esos yankies que se quedan contigo.

Bea, el entusiasmo con el que enfrentas la vida me ha ayudado cada día que he pasado a tu lado, tanto dentro del laboratorio como fuera de él. Tu curiosidad científica y tu inteligencia te llevarán lejos (a Australia por lo menos...) aunque, como bien sabemos las dos, tendrás que controlar para que el trabajo no absorba tu energía vital. Te he echado de menos este último año, espero que la vida nos vuelva a juntar siempre.

Benjas, gracias por aportar siempre tanta calma al laboratorio y enseñarme que de vez en cuando no está mal improvisar un poco.

A las últimas incorporaciones del laboratorio Baonza, en especial a Nerea, por ser tan dulce y recordarme cómo se veía la vida hace diez años, y a Javi, por ser tan buen alumno y ayudarme tantísimo como lo has hecho. Siempre me sorprendes con ese humor que tienes tan escondido, pero que ya empieza a salir a relucir. También mi cariño para Sergio y Sara, que estoy segura de que tendrán un gran futuro en la ciencia.

Mercedes, llevas a rajatabla esto de ser científico porque cumples el dogma más importante: dudar de todo lo que se te presenta como cierto. Gracias por ser tan divertida y llenar todas las conversaciones de anécdotas y sabiduría mundana. Gracias también por levantarme el ánimo tantas veces.

Gracias a Cris Molnar por todo lo que he aprendido de ti todos estos años, no sé que habría sido de mí si en cada crisis no te hubiera tenido cerca para salvarme del caos. Gracias también por

nunca decir que no a una cerveza a tiempo, esto último es tan importante como cada experimento, aunque no salga en el “Maniatis”.

Gracias a María, por ayudarme cada vez que me has visto en apuros y emocionarte tanto con cada evento importante de mi vida. Eres rigurosa en tu trabajo y pasional en la vida, gracias por ser mi amiga y demostrármelo siempre.

Cova, apasionada y enérgica en cada empresa de tu vida, y dulce y sensible por dentro. Gracias por contagiar por todas partes tu entusiasmo y por tomarte tan en serio todo lo que te pido. Gracias por hacerme reír tanto, has sido una compañera increíble.

Gracias a Ana López por nuestras conversaciones a primera hora de la mañana, en las que ponemos el mundo en orden y nos quedamos tan a gusto. Gracias por ayudarme siempre que te he necesitado, y preocuparte siempre por mí.

Gracias a Mar, con la que he compartido tantas excursiones a nuestras clases de yoga. Eres super cumplidora con tu trabajo y cariñosa con todos. Gracias por darme siempre tu punto de vista tan especial sobre las cosas.

Ana Ruiz, gracias por ser tan alegre y contagiarnos a todos con tu entusiasmo. Gracias por todo lo que me has ayudado, ¡siempre tienes el protocolo adecuado en alguna de tus innumerables carpetas! Gracias también por ser un poco nuestra mami, que se preocupa por todos y nos trae desayuno.

Carlos, tu punto de vista se ha convertido en fundamental para todos desde que llegaste, gracias por compartir opiniones e ideas sobre mi trabajo, sabes que me has ayudado muchísimo. Gracias también por saber combinar tu diligencia en el trabajo con un gran sentido del humor.

Gracias a Marta, que nos hace salir de nuestro mundo y nos enseña tantas cosas nuevas, con mucho entusiasmo y dedicación.

Gracias a Cristina Grande, por ser siempre tan cariñosa conmigo y alegrarte de todos mis éxitos.

Sergio, eres tan cariñoso como buen compañero. Gracias por estar siempre disponible para ayudar a lo que sea, vales un montón y el tiempo lo demostrará.

Gracias a Martín, que se fue hace tiempo del laboratorio, pero con el que compartí muy buenos ratos. Gracias por hacerme reír tanto con tu lado más freak.

A las últimas incorporaciones del labo, Almudena y Cris Martinez. Gracias Almu por tu super energía vital y tu capacidad para empatizar con todos, y por supuesto ¡por traer un poco de buena música al labo! Cris, eres un encanto, gracias por tu ayuda con las correcciones de la Tesis, creo que en el laboratorio han ganado una gran compañera.

Muchísimas gracias también a toda la buena gente que puebla los laboratorios del departamento de Desarrollo. He aprendido muchísimo de todos vosotros y me considero muy afortunada de pertenecer a esta generación de “moscólogos”.

Gracias a los servicios de Microscopía óptica y confocal y Genómica del CBM. Sois todos grandes profesionales y me habéis ayudado muchísimo en estos años.

Para finalizar esta parte que tiene que ver con el ambiente laboral, quiero dar las gracias al CSIC por otorgarme la beca que me ha financiado los últimos cuatro años. Esta ayuda desgraciadamente ya no se concede en esta institución, que es la cuna de la ciencia en España. Espero de todo corazón que entre todos tengamos el coraje (y la ayuda por parte de las altas esferas del poder) para reflotar la ciencia en este país, lleno de mentes pensantes con grandes ideas de futuro.

Gracias a todos los amigos que me ayudaron a comenzar mi carrera científica allende los mares en la Fundación Jiménez Díaz, y que hoy siguen siendo parte de mi vida.

Gracias a Vero, que me enseñó a dar mis primeros pasos en el mundo de la pipeta, siempre tan cariñosa, paciente e inteligente (mucho más de lo que ella se cree...). A Juanan, que fue un gran compañero, y que sobre todo tiene un gran corazón. A Gloria, mujer maravillosa a la que adoro y admiro, como científico y como madre. Espero que la vida nos lleve siempre de la mano. A Maru, una valiente donde las haya. Espero que Fer y yo sepamos devolverte todo el cariño que tú nos das. A Marina, que siempre sabe salir adelante, aunque las piedras que se le pongan en el camino sean tan grandes que las tenga que saltar con pértiga. Sabes combinar a la perfección el llamar a las cosas por su nombre sin dejar de ser siempre increíblemente cariñosa. ¡Ánimo valiente!

A mi chupi-pandi de amigos, que no se arrugan ni ante un agotador cartel de festival de cinco días al sol. Sois capaces de levantar el día más chungo, no sé qué habría sido de mí sin vosotros.

Dani, comenzaste siendo mi compañero de laboratorio, pero ahora somos mucho más, somos amigos de corazón. Te quiero y admiro a partes iguales. Gracias por poner tus ideales por delante de todo, aunque eso suponga que te vea menos, y por reservar siempre un hueco en tu vida para los amigos importantes.

A Aroa, que vale un millón de veces más de lo que se cree. Eres una amiga incondicional, capaz de sujetarme la copa toda la noche en mi despedida de soltera sin perder un ápice de entusiasmo. Tu faceta de MacGyver me vuelve loca, menos mal que nos has traído a Vero...

¡Vero! Mi maravillosa canaria hiperactiva (sí, es posible ser ambas cosas y no explotar...). Aguantas lo que te echen, incluso aunque no te sepas el nombre de ningún grupo del festival, o aunque vuelvas de una jornada de interpretación maratoniana, seguida de el cuidado de un chaval con autismo que te ha mordido un brazo... Eres fantástica, gracias por estar siempre ahí, y por convertirte en alguien tan importante en nuestras vidas.

Raúl, la persona más cariñosa y sensible que conozco. He vivido contigo grandes cambios en tu vida, y me siento orgullosa de ti y feliz de ser tu amiga. Siempre se puede contar contigo, y te agradezco infinito todo lo que te preocupas por mí. Te quiero como eres, así que no cambies nunca.

Jessi, nuestra pelirroja favorita, que ha demostrado que Zaragoza puede producir una muchacha que sabe cantar “yo amo el jamón” a voz en grito, sin que desentone con su moderno atuendo. Eres una fuente inagotable de energía y entusiasmo, pero con el corazón blandito. Gracias por ser mi amiga desde el día que se cruzaron nuestras miradas, y espero que los neoyorquinos que te cruzas a diario sepan admirar lo que tienen delante. Te echo de menos.

Lola, eres una amiga incondicional, siempre dispuesta a echarse una charleta dónde y cuándo sea. Estás llena de energía y alegría, tanta como para resucitar a un muerto, y de grandes ideales, por los cuales luchas a diario sin “desatender” a ninguna de tus amistades. Eres un sol.

Al resto de los biolokos, gracias a todos por ser tan cariñosos conmigo desde el día que nos conocimos. Quiero dedicar unas palabras especiales a algunas personas.

Gracias Mila por ser como eres, combinación termodinámicamente estable de inteligencia, sensibilidad y frikismo. Gracias por quererme tanto y preocuparte tanto por mí, y por todas las risas que nos hemos echado juntas. Eres muy importante en la vida de Fer y mía, te queremos amiga. Gracias a Martín, por hacer que se nos desencaje la mandíbula cada vez que abre la boca, y devolverle a la ciudad de Madrid el argot que nunca debió abandonar.

A Mirian, por ser una amiga tan fiel, que está siempre ahí cuando se la necesita. Estás a todo: familia, amigos, trabajo... Gracias por acordarte hasta del detalle más insignificante de nuestras vidas.

A Carmen, por alegrarse tanto siempre de cada uno de mis éxitos y estar siempre ahí para celebrarlos. ¡La próxima eres tú!

A mis compañeras de facultad, Amelia, Ana, Cristina y Patricia, porque siempre sabemos generar el milagro de coordinar nuestras apretadas agendas para ponernos al día. Gracias a todas por interesaros por mis últimos avances, científicos y personales.

A mis cuñados, Cristina, Javier, María y Miguel. Gracias por quererme y hacerme partícipe desde el primer día de vuestras vidas, y darme unos sobrinos maravillosos a los que adoro, y que me alegran el día cada vez que los veo.

A Marta, siempre orgullosa de cada uno de mis pequeños éxitos, superando incluso el terrible pensamiento de imaginar mi trabajo con las moscas. Gracias por quererme tanto, y demostrármelo siempre.

A Fernando, que supuso un ejemplo de coraje tan importante para mí que no lo olvidaré nunca. Te echamos de menos.

A la familia Vallespín, Rosa, Jose Ramón, María y Elena, porque como siempre hemos dicho nosotros, para ser familia no hace falta compartir apellido. Gracias en especial a Rosa, que me ayudó a comenzar mi carrera científica, y que supo aceptar perfectamente los cambios que vinieron después.

A mis tíos Inés y Paco, y mis primos Natalia y Juanfran, porque siempre habéis estado a mi lado y sé que siempre podré contar con vosotros. Os quiero.

A mis abuelos, Dora y Manolo, Paco y Deme.

Mi abuela Dora fue una mujer valiente y pionera, y el mejor ejemplo de lo que significa amar a los demás sobre todas las cosas. Te echo de menos cada día.

Mi abuelo Paco era la persona con más ganas de vivir del mundo entero. Gracias por regalarnos los oídos con tu fantástico sentido del humor, espero haber ascendido con este libro a la categoría de “plumilla”. Te echo mucho de menos.

Gracias también a mi abuelo Manolo, que me enseñó a amar la música desde muy pequeña.

A mi abuela Deme, que tanto cuida de Fer (o Feder..) y de mí. Te admiro muchísimo porque eres una mujer valiente, inteligente y moderna, aunque no estoy segura de que tú lo sepas. Te quiero abuela.

A mis padres Susana y Manolo, por apoyarme en cada empresa de mi vida, y no sólo con palabras, también con hechos.

Mamá, gracias por tu bondad, por tu alegría y tu sonrisa. Por ser la mejor madre del mundo entero, en los días buenos y en los malos.

Papá, gracias por enseñarme a ser justa, trabajadora y constante, y por hacerme sentir que pase lo que pase, siempre siempre podré apoyarme en ti.

Os quiero muchísimo a los dos.

A Fer, porque desde que me viste supiste que siempre estarías a mi lado. Porque siempre me apoyas en mis decisiones, y me enseñas a no correr y pensármelas dos veces. Gracias porque aunque estos años a veces han sido difíciles, tu magnífica bondad y tu amor han hecho que supere cada dificultad que me he encontrado. Gracias por atreverte a todo, si es conmigo, y porque este dueto no ha hecho más que empezar el álbum de su vida.

A mi hijo, que aún no ha nacido, pero que me ha acompañado muchísimo durante la escritura de esta Tesis, recordándome (y es sólo el principio) que lo mejor de todo me espera siempre en casa.

Publicaciones

Durante el periodo de desarrollo de esta Tesis, el doctorando ha publicado los siguientes artículos:

San Juan, B.P., **Andrade-Zapata, I.**, Baonza, A., (2012). The bHLH factors Dpn and members of the E(spl) complex mediate the function of Notch signalling regulating cell proliferation during wing disc development. *Biology Open* 1, 667-676

Andrade-Zapata, I., Baonza, A., (2014). The bHLH factors Extramacrochaetae and Daughterless control cell cycle in *Drosophila* imaginal discs through the transcriptional regulation of the *cdc25* phosphatase *string*. *Plos Genetics* (EN PRENSA).

